

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA BADELUK CETTINA

“Análise morfológica da ação dos níveis subletais do organofosforado Folidol® 600 sobre as brânquias do peixe de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824)”.

CURITIBA
2008

LUCIANA BADELUK CETTINA

“Análise morfológica da ação dos níveis subletais do organofosforado Folidol® 600 sobre as brânquias do peixe de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824)”.

Monografia apresentada a disciplina
Estágio em Biologia Celular, como
requisito parcial a conclusão do curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Dra. Lucélia Donatti
Departamento de Biologia Celular

Curitiba
2008

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer imensamente a minha sempre querida, presente e essencial família! Ao meu pai, Luciano, a minha mãe, Fátima, e ao meu irmão, Marlon, que sempre acreditaram em mim, me deram todo o apoio e carinho e me passaram os melhores valores. Fizeram-me entender que nós somos uma coisa só em todos os momentos e que a família, o otimismo, a perseverança, a felicidade, a dedicação, o bom humor e os sonhos são fundamentais nessa vida! Ao restante da família Badeluk e Cettina, por incentivar a formação da primeira bióloga ou “biologista” da família. Em especial a tia Carmen, pelo amor, presença (que mesmo longe nunca deixou de estar aqui) e estímulos constantes.

A Edith Fanta que orientou os meus primeiros passos dentro da pesquisa e me mostrou que com força de vontade, disposição e dedicação alcançamos nossos objetivos. E também pelo incentivo e por me fazer gostar ainda mais dos peixes.

A Lucélia Donatti, pela orientação, pela amizade, pela oportunidade, por me acolher e me auxiliar.

A Gisele Aparecida de Melo pela elaboração e execução do projeto de sua dissertação e pelo empréstimo do material, sem o qual essa monografia não teria sido realizada.

A professora Flavia pela simpatia e amizade. Ao pessoal do laboratório de Biologia Adaptativa por me receber e pelos bons momentos de convivência.

Ao Fábio (Gaucho) pela amizade e por ter me acompanhado em grande parte dos meus primeiros afazeres de laboratório.

Quero agradecer a todas as pessoas que fizeram com que esses anos de biologia fossem muito mais intensos, interessantes, inesquecíveis e felizes! Por isso e também por todo o carinho, amizade, apoio, risadas, conversas, companheirismo, cumplicidade, conselhos, deixo os meus mais sinceros agradecimentos a vocês, que foram, são e sempre serão deveras especiais e importantes na minha vida: Mari, Grazi, Fran, Tali, Lucielle, Netto, Raul, Nirto, Gabi, Nahyr, Vini, Marina Mazanek, Polly, Fer M., Camila Valente, Halina, Nani, Thais (Kika), Bel, Mineira, Fer Gurgel, Bruno, Maíra, Julia, Jéssica...

Agradeço também aos demais colegas e amigos da turma 2004/01. Aos meus primeiros colegas de estágio no museu de ciências naturais. As meninas do futebol e do vôlei, que me proporcionaram grandes jogos, jogadas e momentos gloriosos, além de risadas antes, durante e após as partidas!

Enfim, a todos aqueles que estiveram ao meu lado e que de alguma forma contribuíram na minha formação e aprendizado, tanto pessoal quanto profissional, nas mais diversas situações e para aqueles que fizeram com que dias felizes e momentos incríveis acontecessem nesses anos, os meus mais sinceros agradecimentos! E agradeço a Deus por tudo isso!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Objetivo Geral	4
1.2. Objetivos Específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Aclimação laboratorial de <i>Rhamdia quelen</i>	17
3.2. Determinação de uma dose subletal de Folidol® 600 para <i>Rhamdia quelen</i>	18
3.3. Testes de toxicidade	20
3.4. Processamento Histológico – Microscopia de Luz	21
3.5. Alterações Histológicas Analisadas	22
3.6. Análise dos Resultados	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para <i>Rhamdia quelen</i>	23
4.2. Descrição histológica da estrutura branquial dos controle	23
4.3. Descrição histológica da estrutura branquial dos experimentais	26
4.4. Índice de Lesão	29
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	39

“Análise morfológica da ação dos níveis subletais do organofosforado Folidol® 600 sobre as brânquias do peixe de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard,1824)”.

RESUMO

Os agrotóxicos freqüentemente têm causado impactos em ambientes aquáticos. A presença de organofosforados na água pode provocar lesões nos peixes. Dentre os organofosforados, o Folidol® 600 é bastante utilizado na agricultura no estado do Paraná, sendo o Paration metílico o seu princípio ativo. Neste trabalho, através da realização de bioensaios em nível subletal, procura-se investigar os efeitos do folidol sobre as brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen* (Jundiá). Os peixes foram aclimatados em laboratório sob condições abióticas controladas. Verificou-se que a dose de 0,01 mg/L é subletal para a espécie no período de 96 horas. Utilizando a dose subletal foram realizados bioensaios e as coletas ocorreram nos tempos de 1h, 2h, 4h, 8 h, 12h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao Folidol®600, sendo que em cada tempo 10 animais de cada grupo experimental foram coletados. Os peixes foram sacrificados após secção medular, a brânquia direita foi retirada, fixada em Alfac e processada para microscopia de luz. Os cortes foram corados em HE e as imagens analisadas e fotografadas em Fotomicroscópio Olympus PM AD. As alterações histopatológicas encontradas nas brânquias foram: descolamento do epitélio, aneurismas, hiperplasias e fusão de lamelas secundárias. O descolamento epitelial foi a alteração histopatológica mais freqüente, estando presente em todos os tempos de exposição ao Folidol® 600 aos quais os peixes foram submetidos. O aneurisma, segunda lesão com maior número de ocorrências, apareceu em todos os tempos de exposição, com maior ou menor intensidade. No tempo de 2 horas foi observado o maior número de aneurismas (80%) enquanto que no tempo 48 horas de exposição à menor porcentagem de aneurisma foi encontrada (20%). As alterações histopatológicas caracterizadas como hiperplasia e fusão de lamelas secundárias não foram evidenciadas no tempo de 24 horas de exposição ao organofosforado Folidol® 600, sendo mais freqüentes nos tempos de 1h, 2h e 8 h. A fusão de lamelas secundárias foi a alteração que se mostrou com menor número de ocorrências. O índice de lesão foi calculado segundo Bernet *et al.* (1999). As alterações histopatológicas encontradas sugerem diminuição na eficiência das trocas gasosas, causando danos aos juvenis do jundiá. O índice de Bernet indica que a higidez dos animais foi comprometida principalmente nas primeiras oito horas de exposição do Folidol® 600. A morfologia branquial de *Rhamdia quelen* foi alterada pela exposição a 0,01mL/L de Folidol® 600.

Palavras-chave: organofosforado, histopatologia, peixes de água doce.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional humano determinou a necessidade de uma maior produção de alimentos através da intensificação das atividades de pecuária e de agricultura o que leva ao aumento da utilização de agrotóxicos. Estes evitam as perdas que poderiam ser causadas pelas pragas nas produções de alimentos (MATAQUEIRO & MACHADO-NETO, 2002).

Os agrotóxicos são divididos em diferentes classes, dentre as quais se podem citar os herbicidas, os fungicidas, os acaricidas, os algicidas, os larvicidas e os inseticidas (COUTINHO *et al*, 2005). Suas funções básicas na agricultura incluem a elevação da produção com o aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e a redução do trabalho e dos gastos com energia (COUTINHO *et al*, 2005). Os agrotóxicos são compostos químicos benéficos, na medida em que protegem contra perdas florestais e agrícolas e podem auxiliar na produção mais eficiente de alimentos. As desvantagens consistem na sua toxicidade para os animais, incluindo o homem, e plantas além da sua persistência no ambiente (AGUIAR *et al.*, 2002; LANGENBACH, 1999).

A grande maioria dos agrotóxicos possui ação ecossistêmica, isto é, uma vez aplicados podem contaminar todos os componentes bióticos e abióticos, como as plantas, o solo, a rede hidrográfica local e atingir organismos não alvo, tais como os peixes, os invertebrados e outros (MATAQUEIRO & MACHADO-NETO, 2002).

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE *et al*, 2000).

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão. A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixos químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como

metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros (RASHED, 2001).

Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e os agrotóxicos. Esses produtos, quando aplicados sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos d'água diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos (ARIAS *et al*, 2007).

Outras formas de contaminação indireta podem ocorrer através da volatilização dos compostos aplicados nos cultivos e pela formação de poeira do solo contaminado e/ou da pulverização de pesticidas, que podem ser transportados por correntes aéreas e se depositarem no solo e na água distantes das áreas onde foram originalmente usados (COOPER, 1993).

Quando lançadas no ambiente aquático, as substâncias oriundas das atividades agrícolas são capazes de interagir com o organismo vivo, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (ARIAS *et al*, 2007). As técnicas que utilizam bioindicadores para a avaliação destes impactos são abordadas geralmente de duas formas: aquelas associadas aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas ou aquelas associadas ao nível individual. Esta última trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímicas e fisiológicas, incluindo modificações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas. Bioindicadores são definidos como componentes biológicos, células, processos bioquímicos, estruturas e funções biológicas, alteradas quando em contato com compostos xenobióticos (ROSENBERG & RESH, 1993 apud ARIAS *et al*, 2007).

Indicadores em diferentes níveis de organização biológica fornecem informações complementares, necessárias para a análise de risco ecológico. Os impactos da contaminação por agrotóxicos em peixes e nos macroinvertebrados variam de acordo com os tipos de substâncias empregadas, com a sua toxicidade e com a estabilidade nos ambientes aquáticos. Os efeitos sobre a fauna incluem

desde alterações fisiológicas em alguns organismos, até a morte maciça de populações, afetando toda a estrutura da comunidade (CLEMENTS, 2000).

Em geral, quanto maior a concentração de pesticidas e mais longo o tempo de exposição, maiores as chances dos impactos negativos atingirem níveis superiores de organização biológica, como as comunidades e os ecossistemas. Se um estresse dura tempo suficiente para levar à morte uma população de organismos, afetando as taxas de crescimento e de reprodução e impedindo o recrutamento de novas espécies, ela é então capaz de alterar a estrutura da comunidade (CAIRNS, 1993 apud ARIAS *et al*, 2007).

Os efeitos dos contaminantes em níveis de organização biológica mais baixos, como exemplo as respostas moleculares e as bioquímicas, ocorrem mais rapidamente. A especificidade das respostas e a nossa compreensão sobre os efeitos dos contaminantes são geralmente maiores nos níveis mais baixos de organização. Geralmente, os efeitos em tais níveis podem ser diretamente ligados à exposição aos agentes contaminantes. Por exemplo, a presença de resíduos químicos e metabólitos é um indicador direto da disponibilidade de contaminantes para os organismos (ARIAS *et al*, 2007).

Levando em consideração a exposição constante da fauna ictiológica a agentes poluidores, em especial aos agrotóxicos, propõe-se nesse trabalho verificar quais os danos que essa exposição pode trazer as brânquias, através da realização de bioensaios, expondo o peixe *Rhamdia quelen* a ação do agrotóxico Folidol® 600, através da aplicação de doses subletais deste agrotóxico.

1.1. Objetivo Geral:

- Analisar os efeitos subletais do organofosforado Folidol® 600 no tecido branquial, em juvenis de Jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARD, 1824) através de análises histopatológicas.

1.2. Objetivos Específicos:

- Descrever as características morfológicas do tecido branquial de *R. quelen*, controle, através de análises histológicas;

- Verificar as alterações morfológicas do tecido branquial de *R. quelen*, submetidos a uma dose subletal de Folidol® 600.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre os pesticidas destacam-se os compostos organofosforados (OPs) amplamente utilizados na agricultura mundial (RODRIGUES & FANTA, 1998; SILVA *et al.*, 1993; SOGORB & VILANOVA, 2002). Os organofosforados são ésteres ou tióis derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (SOGORB & VILANOVA, 2002). As propriedades inseticidas dos organofosforados foram evidenciadas a partir de 1937 por Gerhard Schrader, na Alemanha, com a síntese do Tabun e do Sarin, do OMPA (octametilpirofosforamida) em 1941, do TEPP (tetraetilpirofosfato) em 1943 e do Paration Etílico em 1944 (LARINI, 1999).

Atualmente, os pesticidas organofosforados, constituindo importante classe de inseticidas, têm sido amplamente usados em substituição aos compostos organoclorados nas atividades agrícolas (VARÓ *et al.*, 2000). Os compostos organoclorados são caracterizados pela persistência no meio ambiente e pela tendência de acumulação na cadeia trófica (NEMR & ABD-ALLAH, 2004). Ao contrário, os organofosforados apresentam a vantagem de serem mais biodegradáveis e terem menor persistência no ambiente (VARÓ *et al.*, 2000; SOGORB & VILANOVA, 2002).

Quanto aos efeitos toxicológicos, os organofosforados são considerados inibidores da enzima acetilcolinesterase (JOKANOVIC, 2001; DE SILVA & SAMAYAWARDHENA, 2002). Esta enzima é necessária para o controle normal da transmissão de impulsos nervosos de fibras nervosas para os músculos e células glandulares, e também para células nervosas em gânglios do sistema nervoso autônomo e no cérebro (CHEREMISINOFF & KING, 1994).

A acetilcolinesterase (AChE) possui a atividade enzimática de catalisar a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético. A acetilcolina permite a propagação bioquímica do potencial de ação entre os neurônios e entre esses e as placas motoras, sendo, logo após à transmissão do estímulo, degradada pela AChE. A inibição da AChE pelos compostos organofosforados é a principal causa

das anormalidades relacionadas à transmissão neuromuscular, sendo os sinais e sintomas da intoxicação proporcionais ao nível de atividade da enzima. A interação entre a AChE e o seu inibidor organofosforado parece envolver apenas o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável (LARINI, 1999).

Tal estabilidade está relacionada com a estrutura química do composto organofosforado (LARINI, 1999). Desta forma, a AChE é inibida, permitindo um acúmulo da acetilcolina nas junções neuromusculares, que produz intensa excitação e despolarização permanente dos músculos esqueléticos.

Segundo WARE (1991), os organofosforados estão entre os agrotóxicos que apresentam toxicidade para os vertebrados. Podem causar intoxicações agudas graves, sendo os responsáveis por um grande número de óbitos.

No homem, após a absorção, os compostos organofosforados concentram-se no organismo, especialmente no tecido adiposo, no fígado, nos rins, nas glândulas salivares, na tireóide, no pâncreas, nos pulmões, nas paredes do estômago e dos intestinos, no sistema nervoso central e nos músculos (LARINI, 1999). Alguns sinais e sintomas mais comumente observados nas intoxicações por organofosforados no homem são os distúrbios no sono, a dificuldade de concentração, a agitação, as convulsões, os tremores, o coma, as náuseas, os vômitos, as dores de cabeça e abdominais, a diarreia, a diurese, a transpiração excessiva e a contração involuntária dos músculos (LARINI, 1999).

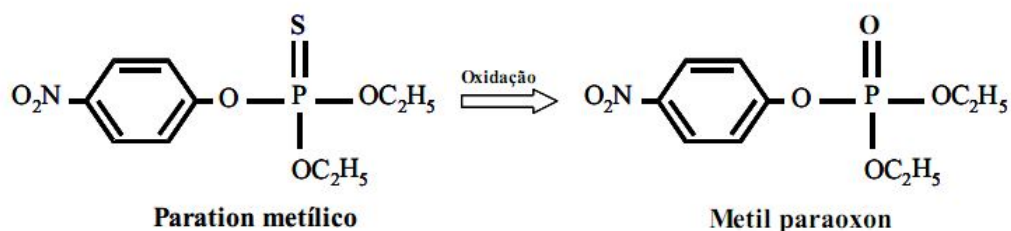
Após a absorção pelo organismo, os compostos organofosforados passam por muitas reações de biotransformação. Quase sempre os organofosforados são substâncias lipofílicas facilitando a penetração através da cutícula dos insetos. As reações de biotransformação têm a função de tornar as moléculas mais polares e hidrossolúveis e, conseqüentemente, mais facilmente elimináveis (MELO & FANTA, 2004).

As reações envolvidas na biotransformação alteram grandemente a toxicidade dessa classe de compostos. Assim, a maioria dos organofosforados, em condição pura, não metabolizada, não inibe a acetilcolinesterase (AChE) ou exibe um potencial inibitório muito baixo. No entanto, a inibição da AChE é grande quando são ativados pela biotransformação (MACHADO & FANTA, 2003). Dentro de condições *in vivo*, o potencial anticolinesterásico dos organofosforados pode ser aumentado grandemente, e o resultado dos efeitos tóxicos representa a

soma de processos bioquímicos de ativação e de detoxicação. A ativação de organofosforados pode ser definida como a transformação metabólica de organofosforados ativos para outros compostos ativos. Detoxicação de organofosforados (Ops) inclui a biotransformação dos mesmos para metabólitos não-tóxicos. Detoxicação ou degradação é a reação mais importante no metabolismo dos compostos OPs no organismo, e a ativação em si finalmente resulta em detoxicação. A biotransformação de OP pode produzir muitos metabólitos tóxicos. Mesmo que a soma dos metabólitos formados nessas reações é baixa, isso pode ser muito significativo quando analisamos o aspecto toxicológico (JOKANOVIC, 2001).

A biotransformação é o resultado de uma conversão metabólica, na qual o grupo P=S é convertido em P=O, processada no retículo endoplasmático dos hepatócitos. O composto formado leva a terminação oxon (Figura 1). No caso do Paration metílico, forma-se o Metil Paraoxon, que é responsável por causar sérias alterações morfológicas no tecido hepático de peixes (DUTTA *et al.* 1993; FANTA *et al.*, 2003; GILL *et al.*, 1988; RODRIGUES & FANTA 1998; RODRIGUES *et al.* 2001; SILVA *et al.* 1993).

Figura 1- Esquema da biotransformação dos compostos organofosforados.



FONTE: Melo e Fanta, 2004.

Os OPs são altamente não seletivos, e geralmente demonstram ser tóxicos para espécies não-alvo incluindo o homem e os demais seres vivos presentes no ambiente (BEGUM & VIJAYARAGHAVAN, 1995; HAGAR & FAHMY, 2002).

As áreas agrícolas tratadas com pesticidas, e entre eles os OPs, freqüentemente possuem corpos de água doce, tais como rios, lagos e

reservatórios de água, os quais abrigam uma diversidade de fauna e de flora aquática (BEGUM & VIJAYARAGHAVAN, 1995). As constantes aplicações de organofosforados nas áreas agrícolas podem resultar em repetidas exposições dos organismos aquáticos

a esses poluentes (BANAS & SPRAGUE, apud RUDNICKI 2004). A água constitui um dos elementos fundamentais para a sobrevivência dos organismos nos ecossistemas. Portanto, se ela estiver contaminada por agrotóxicos, pode-se considerar que todos os demais componentes do ecossistema sejam eles bióticos ou abióticos, estarão contaminados, pois a água está presente em todas as regiões (MACHADO NETO, 1991). Os agrotóxicos, presentes no meio aquático, podem atingir o homem pela ingestão de água e de alimentos contaminados, dentre eles os peixes. Os peixes entram em contato direto com os agrotóxicos pela via dérmica e pelas brânquias, e pela via oral em todo o trato gastrointestinal (FANTA, 1991).

Os pesticidas contaminam os sistemas aquáticos por ação do vento, do despejo direto de restos de soluções pesticidas, da lavagem dos recipientes e pelos utensílios utilizados na aplicação, da contaminação do solo com os pesticidas aplicados nas plantas e da remoção dos pesticidas do solo por ação das águas pluviais e lixiviação ao meio aquático (FELLENBERG, 1980). Animais aquáticos podem assim, ser contaminados pela exposição hídrica aos pesticidas. Sabe-se que os peixes são particularmente sensíveis à contaminação com pesticidas (FELLENBERG, 1980). Segundo FANTA *et al.* (2003) muitos pesticidas permanecem em níveis subletais no meio aquático por períodos curtos ou longos e não são verificados seus níveis, já que não causam a morte imediata de peixes. Entretanto, mesmo em níveis subletais, os pesticidas organofosforados podem alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos quando atingem os órgãos dos peixes (SANCHO *et al.*, 1992).

Segundo JOHNSON *et al.* (1993), a análise histológica é um método rápido e eficaz para se determinar os efeitos dos agentes químicos em tecidos e órgãos, pois ocorrem alterações na morfologia em resposta ao estresse subletal ou crônico.

Vários órgãos podem ser utilizados nas análises histopatológicas envolvendo organismos submetidos a poluentes. Os órgãos de peixes mais afetados pelos

agentes químicos são as brânquias e a pele, pois exibem grande superfície de contato e ambos apresentam células de muco, que possuem papel importante na resistência aos patógenos e as substâncias tóxicas (SHEPHARD, 1994). A seguir, os agentes químicos têm atuação sobre o fígado, que tem papel fundamental no metabolismo das substâncias tóxicas e sobre o rim, que atua na manutenção da estabilidade interna e na excreção (JOBLING & SUMPTER, 1993).

As brânquias são uma via para a ação de xenobiontes solúveis (STENTIFORD *et al.*, 2003). O epitélio branquial dos peixes é um tecido extremamente sensível, altamente dinâmico e metabolicamente ativo (HINTON *et al.*, 1992, POLEKSIC & MITROVIC TUTUNDŽIC, 1994).

Para POLEKSIC & MITROVIC TUTUNDŽIC (1994) as brânquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas respiratórias.

Os efeitos morfológicos resultantes da exposição de pesticidas organofosforados em peixes têm sido relatados por diversos autores. O estudo de RICHMONDS & DUTTA (1989) no tecido branquial do peixe *Lepomis macrochirus* após a exposição aguda ao organofosforado Malation, revelou a presença das alterações necrose das lamelas secundárias, edema, descolamento do epitélio e fusão de lamelas secundárias. Também nas brânquias do peixe *Oreochromis niloticus*, exposto ao Malation, foram observadas as alterações histopatológicas de descolamento do epitélio, destruição da integridade das lamelas secundárias e fusão lamelar (CAPINPIN, 1994).

No fígado do peixe *Brachydanio rerio* o organofosforado Dimetoato causou desarranjo celular, núcleos picnóticos e necrose (RODRIGUES & FANTA, 1998). Também no tecido hepático de *Heteropneustes fossilis* após exposição aguda ao Malation, foi observado vacuolização, núcleos picnóticos e diminuição do diâmetro nuclear (DUTTA *et al.*, 1993). FANTA *et al.* (2003) observaram no fígado de *Corydoras paleatus* contaminado com o organofosforado Folidol® 600, necrose, núcleos picnóticos, vacuolização e lateralização nuclear.

MACHADO & FANTA (2003), investigaram os efeitos de um composto organofosforado, o Paration metílico, em brânquias de *Metynnis roosevelti* expostos a doses letais (7 ppm) e subletais (1 ppm) de Mentox 600 CE.

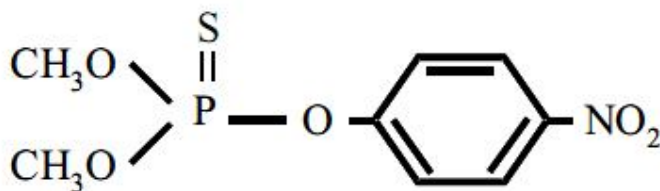
Observações em microscopia de luz e eletrônica de varredura evidenciaram enrugamento do epitélio branquial, seguido por descolamento e hiperplasia. Externamente, os filamentos branquiais apresentaram desaparecimento gradual das microssaliências. Os resultados mostram que, mesmo em doses subletais, o organofosforado pode levar o animal a sofrer conseqüências secundárias decorrentes das alterações da superfície de trocas gasosas e iônicas.

GUIMARÃES (2000), estudando os efeitos do uso do organofosforado Trichlorfon contra parasitoses em peixes usados na prática de piscicultura, analisou a morfologia das lamelas branquiais em peixes e verificou alterações a partir de 4 horas de exposição a uma dose de 0,25 ppm. As lamelas secundárias apresentaram edemas, grande proliferação celular, perda da forma e focos de fusão lamelar. Estas alterações foram observadas em conjunto e de forma generalizada até 48 horas de exposição ao Trichlorfon, com exceção dos edemas lamelares, os quais perduraram até 96 horas de exposição. Foi observada ainda a presença de congestão sanguínea em alguns tempos de exposição.

GILL *et al.* (1988) realizaram um trabalho com um peixe de água doce exposto cronicamente por 60 dias a dois diferentes tipos de organofosforados, o Carbaril e o Dimetoato, ambos em doses subletais, buscando analisar as lesões branquiais. Separação do epitélio lamelar, trombozes lamelares, enrolamento e inchaço da lamela secundária e hipertrofia das células de cloreto foram as alterações observadas.

O Folidol® 600, organofosforado utilizado neste trabalho, apresenta em sua composição 600 g/L do princípio ativo Paration metílico (Methyl Parathion) (LARINI, 1987 apud MELO & FANTA, 2004). Quimicamente, o Paration metílico é chamado de 0,0-dimetil-0-(4-nitrofenil) fosforotioato (Figura 2), sendo o nome técnico ou comum Paration metílico, Metil-paration, Metacide e Folidol 600, entre outros.

Figura 2 - Fórmula estrutural do Paration metílico.



FONTE: Melo & Fanta, 2004.

O Paration metílico possui peso molecular de 263,20 e a fórmula bruta $C_8H_{10}NO_5PS$. Quando puro, é um sólido cristalino de cor branca, com ponto de fusão de 35-36°C. O produto de grau técnico é um líquido de coloração marrom com cheiro ativo de alho, tendo uma densidade que oscila de 1,20 a 1,36. Contêm cerca de 80% do composto puro (MELO & FANTA, 2004).

O Paration metílico é pouco solúvel em água (55-60 ppm a 25°C) e bastante solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Decompõe-se rapidamente em meio alcalino em proporção mais acentuada que o Paration etílico, transformando-se em diversas impurezas como o paraoxon metílico e o O,S-dimetil-S-(4-nitrofenil) fosfato. É utilizado quase que exclusivamente como inseticida não sistêmico, na forma de concentrado emulsionável (em concentrações de até 60%), nas culturas de algodão.

O seu uso é restrito em função de sua elevada toxicidade. Em água neutra, mantém sua estabilidade por diversos dias (LARINI, 1999).

A sua utilização, diluído em água, é feita por pulverizador costal, pulverizador de barra tratorizado, ou ainda por via aérea. Com isso, é fácil inferir que esse pesticida acabe por contaminar as águas vicinais das glebas cultivadas, diretamente ou carregado pelas chuvas. Um dos seus efeitos deletérios é o de que os organismos aquáticos, particularmente os peixes, são afetados por tal prática (MELO & FANTA, 2004).

Os Teleostei, grupo mais diversificado de peixes ósseos, tem aproximadamente 24.000 espécies viventes (POUGH et al, 2003). São amplamente adaptados ao habitat aquático, sendo especializados para a vida em ambientes tão diversos como as grandes profundezas oceânicas, os recifes de corais, as águas rasas e litorâneas, as poças de maré, os lagos, os rios e as

cavernas, entre outros (POUHG *et al*, 2003). Os hábitos de vida dos peixes estão relacionados com as estruturas e suas funções nesses organismos. As conseqüências eco-fisiológicas e eco-toxicológicas decorrentes da exposição de peixes a agentes estressantes naturais ou artificiais em seus ambientes naturais têm colaborado para um melhor entendimento dos processos fisiológicos desses organismos (RANKIN & JENSEN, 1993).

Os corpos de água contêm substâncias dissolvidas, como os sais, os gases, os compostos orgânicos e os poluentes. Além da temperatura da água, esses são os fatores de maior importância fisiológica para os organismos aquáticos (SCHIMIDT, 1996).

A estrutura geral das brânquias segue um padrão nos peixes teleósteos, havendo pequenas variações entre as espécies (RANDALL *et al.*, 2000). A estrutura branquial consiste de três componentes: os arcos branquiais, as lamelas primárias e as lamelas secundárias. Os arcos branquiais atuam como suporte das lamelas primárias, as quais sustentam as lamelas secundárias, e estas são os locais onde ocorrem as trocas gasosas (LAURENT, 1982).

Os peixes teleósteos possuem quatro pares de arcos brânquias situados no interior de cada cavidade faríngea (FERGUSON, 1995). Cada arco é suportado por um esqueleto ósseo sendo constituído por filamentos ou lamelas primárias. Em ambos os lados de cada lamela primária estendem-se filamentos semicirculares denominados de lamelas secundárias (FERGUSON, 1995). Basicamente, cada lamela secundária é composta de uma ou duas camadas de células epiteliais que são mantidas separadas por células pilares. Esse epitélio é denominado de epitélio respiratório. As células pilares apresentam prolongamentos que delimitam os espaços sanguíneos, no interior dos quais o sangue flui. O tecido epitelial está sustentado por uma membrana basal que está em contato íntimo com as células pilares (FERGUSON, 1995).

As brânquias realizam várias funções vitais para os peixes, tais como as trocas gasosas, a osmose e a difusão iônica, quando há presença de gradientes (RANDALL *et al.*, 2000; EVANS, 2007), a excreção de produtos metabólicos finais nitrogenados (GOLDSTEIN, 1982 & JOHANSEN, 1982 apud RUDNICKI, 2004), a excreção extrarenal de íons (HARTL *et al*, 2000) e a regulação ácido-base (GOSS *et al.*, 1994).

Sobre as brânquias passa um fluxo unidirecional de água, que provem da boca e é eliminada através dos opérculos. As superfícies respiratórias das brânquias são projeções delicadas da porção lateral de cada arco branquial. A troca de gases ocorre nas numerosas projeções microscópicas dos filamentos, chamadas de lamelas secundárias ou lamelas respiratórias. O arranjo vascular das brânquias maximiza a troca de oxigênio num sistema de contra- corrente, isto é, flui na lamela em direção oposta aquela da água, através de um plexo formado pelas células pilares. Isso ajuda na utilização eficiente do oxigênio, pois o sangue que abandona as lamelas está em íntimo contato com a água que apresenta máxima tensão de oxigênio e mínima tensão de dióxido de carbono (SCHMIDT,1996) facilitando com isso a ação dos poluentes. Cada filamento branquial possui duas artérias, isto é, um vaso aferente, que vai do arco branquial até a ponta do filamento, e um vaso eferente, através do qual o sangue retorna para o arco. Cada lamela secundária tem um espaço sanguíneo, conectado aos vasos aferentes e eferentes (SCHMIDT, 1996; POUGH *et al.*, 2003).

MALLAT (1985) realizou um levantamento estatístico sobre os tipos de respostas branquiais frente a agentes físicos e químicos presentes no ambiente, e listou a frequência de registro de cada tipo de lesão branquial. Utilizou estes dados para relacionar as lesões branquiais com a dose e o tipo do agente tóxico, a temperatura e o habitat (marinho ou de água doce). Enfocando principalmente as regiões lamelares e interlamelares, as alterações morfológicas mais encontradas, pela ordem, foram o descolamento do epitélio, a necrose, a fusão lamelar, a hipertrofia das células epiteliais, a hiperplasia ou fusão das lamelas por crescimento celular, a diminuição da área de superfície respiratória, a ruptura das células epiteliais, a hipersecreção de muco, o aneurisma lamelar, a congestão vascular, a proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto, a infiltração de leucócitos no epitélio e as alterações no espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares.

A sua multifuncionalidade, a vasta área de superfície que ocupa e a sua localização relativamente ao meio externo fazem das brânquias um órgão chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas das brânquias são reconhecidas como um método rápido

e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes poluentes nos peixes (ARELLANO *et al.*, 1999).

O jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824), modelo biológico utilizado neste trabalho, tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, até o centro da Argentina ao sul, ocorrendo em todo o Brasil (GOMES *et al.*, 2000). Segundo esses autores, *R. quelen* (Fig. 3) é classificado taxonomicamente na família Pimelodidae e gênero *Rhamdia*. No Brasil, é comumente chamado jundiá, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca (GOMES *et al.*, 2000).

A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (GOMES *et al.*, 2000).

Figura 3- Exemplar de *Rhamdia quelen*..



Fonte: http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=500 (Acesso em 12/09/2008).

Apresenta o corpo desprotegido de escamas. *R. quelen*, vivem em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e à vegetação. Escondem-se entre as pedras e os troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GOMES *et al.*, 2000). Juvenis de *R. quelen* suportam a transferência de água de 0% a 10% de salinidade, o que indica que essa espécie é estenoalina. Segundo GOMES *et al.* (2000), os juvenis suportam uma variação de pH na faixa de 4,0 a 8,5.

Essa espécie pode ser considerada euritérmica, pois os juvenis aclimatados a 31°C suportam temperaturas de 15 a 34°C. O crescimento de *R. quelen* aumenta com o incremento da temperatura. Esse crescimento é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. A taxa de crescimento dos machos é maior do que a das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte, pois estas passam a crescer mais rapidamente. Conseqüentemente, as fêmeas apresentam maior comprimento e idade que os machos, sendo que o tempo de vida estimado das fêmeas é de 21 anos e dos machos de 11 anos (GOMES *et al.*, 2000).

Adultos de *R. quelen* são onívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Essa espécie movimenta-se à noite e sai de seus esconderijos depois das chuvas para se nutrir dos entulhos deixados ao longo dos rios (GOMES *et al.*, 2000). A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos (GOMES *et al.*, 2000).

R. quelen possui boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes e apresenta alto potencial de comercialização, tornando-se uma ótima opção para o fomento da piscicultura (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002).

Desta forma, considera-se que a espécie de peixe escolhida como organismo teste apresenta características importantes como modelo biológico, por ser um peixe de fácil aquisição, fácil adaptação ao laboratório, é uma espécie nativa, de grande interesse comercial e muito abundante nos rios do Estado do Paraná (MELO & FANTA, 2004).

Testes de toxicidade aguda em peixes são exigidos pela Legislação Brasileira para regular e classificar os pesticidas usados no Brasil. Apesar de *Brachydanio rerio* ser uma espécie padrão usada nesses bioensaios, devido à facilidade de manutenção em condições laboratoriais, ela não é uma espécie nativa da ictiofauna brasileira. Já, *Rhamdia quelen* é um peixe nativo nos rios do estado do Paraná onde OPs são freqüentemente usados, e conseqüentemente uma possível vítima dos efeitos desses compostos no ambiente natural. O uso dos peixes na fase juvenil e do OP em dose subletal visa alertar sobre possíveis efeitos de substâncias tóxicas em uma concentração permitida pela legislação ambiental em peixes que ainda não passaram pela primeira reprodução. Neste

trabalho, a proposta é usar a morfologia das brânquias de juvenis de *R. quelen* como indicador dos efeitos subletais da ação do Folidol® 600, um dos OPs de amplo uso na agricultura do estado do Paraná e do sul do Brasil na atualidade (MELO & FANTA, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte do projeto “Análise morfológica da ação dos níveis subletais do organofosforado Folidol® 600 sobre as brânquias e o fígado do peixe de água doce *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824)”. As análises relacionadas ao fígado fizeram parte da dissertação de mestrado da acadêmica Gisele Cristiane de Melo Dias sob orientação da Profa. Dra. Edith Fanta (MELO & FANTA, 2004). Este trabalho de conclusão de curso teve o objetivo de realizar as análises das brânquias dos experimentos citados acima. Segue a descrição detalhada dos experimentos realizados.

3.1. Aclimação Laboratorial de *Rhamdia quelen*

Os exemplares de *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) (Pimelodidae) utilizados nos experimentos de determinação da dose subletal e dos testes de toxicidade do organofosforado Folidol® 600 foram doados pela piscicultura “Patronato Santo Antônio” da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (São José dos Pinhais – Paraná).

Os exemplares *R. quelen* utilizados na determinação da dose subletal de Folidol® 600 foram aclimatados ao laboratório por um período de sete dias, em aquários de 120 L, contendo água da rede de distribuição previamente purificada em dois filtros de polipropileno e dois filtros de carvão ativado. A água dos aquários foi aerada continuamente com a ajuda de compressores de ar acoplados a filtros contendo fibra acrílica e a temperatura foi ajustada através de aquecedores controlados por termostato. Os aquários tiveram suas faces laterais e posteriores revestidas com papel “contact” verde, proporcionando uma melhor adaptação dos peixes ao ambiente de laboratório (FANTA, 1995). Variáveis como o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidas e registradas a cada 24 horas (ABNT, 1993; CETESB, 1990; IAP, 1997). Os aparelhos utilizados para verificar as variáveis foram o EXTECH Model 695 pH/Conductivity e o MO128 Dissolved Oxygen Meter.

O pH da água foi de 7,1 ($\pm 0,3$), a temperatura de 26°C ($\pm 0,6$) e o oxigênio dissolvido de 6,1 mg/L ($\pm 0,3$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz / 10 horas escuro.

Os indivíduos foram alimentados uma vez ao dia, com ração Kowalski® para crescimento (extrusada) com 45% de proteínas. Devido a ração apresentar alta quantidade de proteínas, a água dos aquários foi trocada de dois em dois dias para evitar o acúmulo de amônia.

Para a realização dos testes de toxicidade, os animais foram aclimatados ao laboratório por um período de sete dias, nas mesmas condições dos animais submetidos à determinação da dose subletal. Os animais permaneceram em condições abióticas constantes, verificadas a cada 24 horas, sendo que a temperatura foi de 27°C (± 1), o pH de 7,3 ($\pm 0,5$) e o oxigênio dissolvido de 5,1 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz/ 10 horas escuro. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, com ração Kowalsky®.

3.2. Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para *Rhamdia quelen*

MOREIRA (1998) determinou a dose letal de 0,04 mL/L do organofosforado Folidol® 600, cujo princípio ativo é o Paration metílico (600g/L) para *Oreochromis niloticus*, a Tilápia do Nilo, em testes de toxicidade de 96 horas. Baseado nesta informação, *R. quelen* foi submetida a concentrações de 0,04 mL/L, 0,03 mL/L, 0,02mL/L, e 0,01 mL/L de Folidol® 600 para a determinação da dose subletal.

Após o período de aclimação, grupos de 10 animais foram submetidos ao período experimental agudo de 96 horas. Os aquários experimentais foram acondicionados em capela de exaustão de gases a fim de evitar a contaminação ambiental. Já, o aquário controle foi mantido em ambiente aberto. Foi estabelecida a relação de 1 grama de peixe para 1 litro de água. Todos os exemplares de *R. quelen* eram juvenis, apresentando peso médio de 1,5 g ($\pm 0,7$), comprimento total de 5,9 cm ($\pm 0,8$) e comprimento padrão de 4,8 cm ($\pm 0,6$).

Os aquários, experimentais e controle, tiveram as mesmas condições abióticas da aclimação, com exceção dos filtros de aeração que continham fibra acrílica. Esses foram substituídos por pedras porosas conectadas em mangueiras de aeração, para evitar que o contaminante fosse absorvido pela fibra.

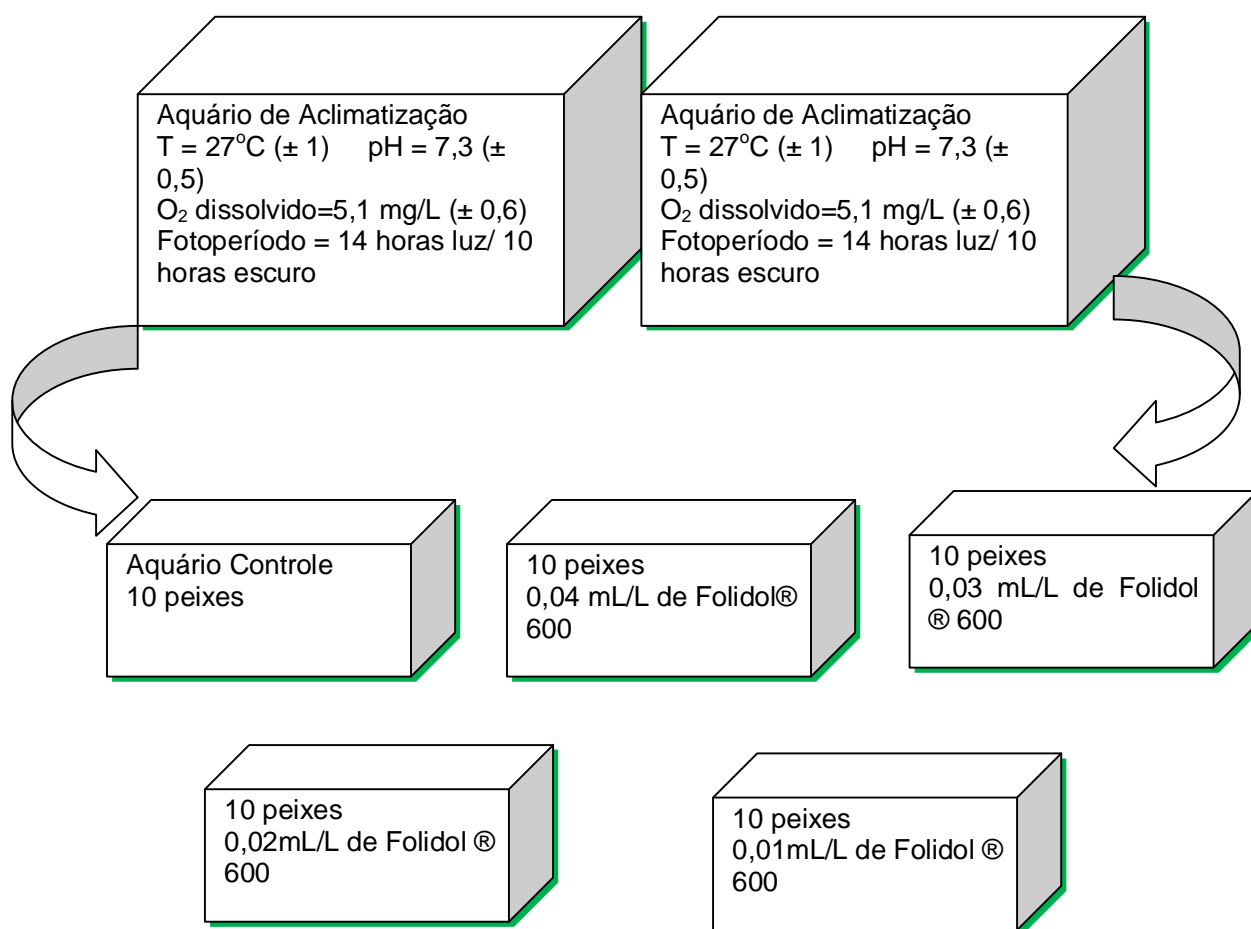
O contaminante foi administrado via hídrica sendo gotejado nos aquários experimentais na superfície próxima ao aerador para que o mesmo se espalhasse

por todo o aquário. A contaminação foi realizada em horário pré-estabelecido, às 09:00 horas.

A determinação da dose subletal foi feita através de um bioensaio estático, isto é, na ausência de fluxo contínuo da água com o tóxico. Variáveis como o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido, foram medidas e registradas a cada 24 horas, até o término do teste (ABNT, 1993; CETESB, 1990; IAP, 1997). O pH da água foi de 7,6 ($\pm 0,4$), a temperatura de 27°C ($\pm 0,3$) e oxigênio dissolvido em 6,2 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz/ 10 horas escuro.

O experimento de determinação da dose subletal de Folidol® 600 foi feito em triplicata e pode ser visualizado na Fig. 4.

Figura 4 - Delineamento Experimental da Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para *Rhamdia quelen*.



3.3. Testes de Toxicidade

Após o período de aclimação, grupos de 10 animais foram submetidos aos testes de toxicidade para o estudo morfológico das brânquias de *R. quelen*. Foi estabelecida a relação de 1 grama de peixe para 1 litro de água. Os animais utilizados apresentaram peso de 1,2 g ($\pm 0,4$), comprimento total de 5,4 cm ($\pm 0,6$) e comprimento padrão de 4,3 cm ($\pm 0,5$). Com base na determinação da dose subletal e considerando que a dose subletal de um agente tóxico é aquela que não causa mortalidade para os organismos teste, *R. quelen* foi submetida experimentalmente a dose de 0,01 mL/L de Folidol® 600. Nesta dose, ocorreu 100% de sobrevivência dos indivíduos em 96 horas de exposição. Os animais pertencentes ao grupo controle permaneceram neste mesmo período e nas mesmas condições abióticas que os experimentais, exceto pela ausência de Folidol® 600.

O teste agudo foi feito através de um bioensaio estático (ABNT, 1993; CETESB, 1990; IAP, 1997) durante um período de 96 horas. Todos os aquários foram contaminados por via hídrica. A contaminação foi realizada em horário pré-estabelecido, às 09:00 horas.

Os aquários experimentais foram acondicionados em capela de exaustão de gases, enquanto que os aquários controle permaneceram fora da capela. Tanto os animais experimentais quanto os animais controle foram alimentados uma vez ao dia com o mesmo tipo de ração oferecida durante a aclimação.

As condições abióticas foram constantes, controladas a cada 24 horas até o término do teste (ABNT, 1993; CETESB, 1990; IAP, 1997), sendo a temperatura de 27°C (± 1), o pH de 7,3 ($\pm 0,5$) e o oxigênio dissolvido de 5,2 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz / 10 horas escuro.

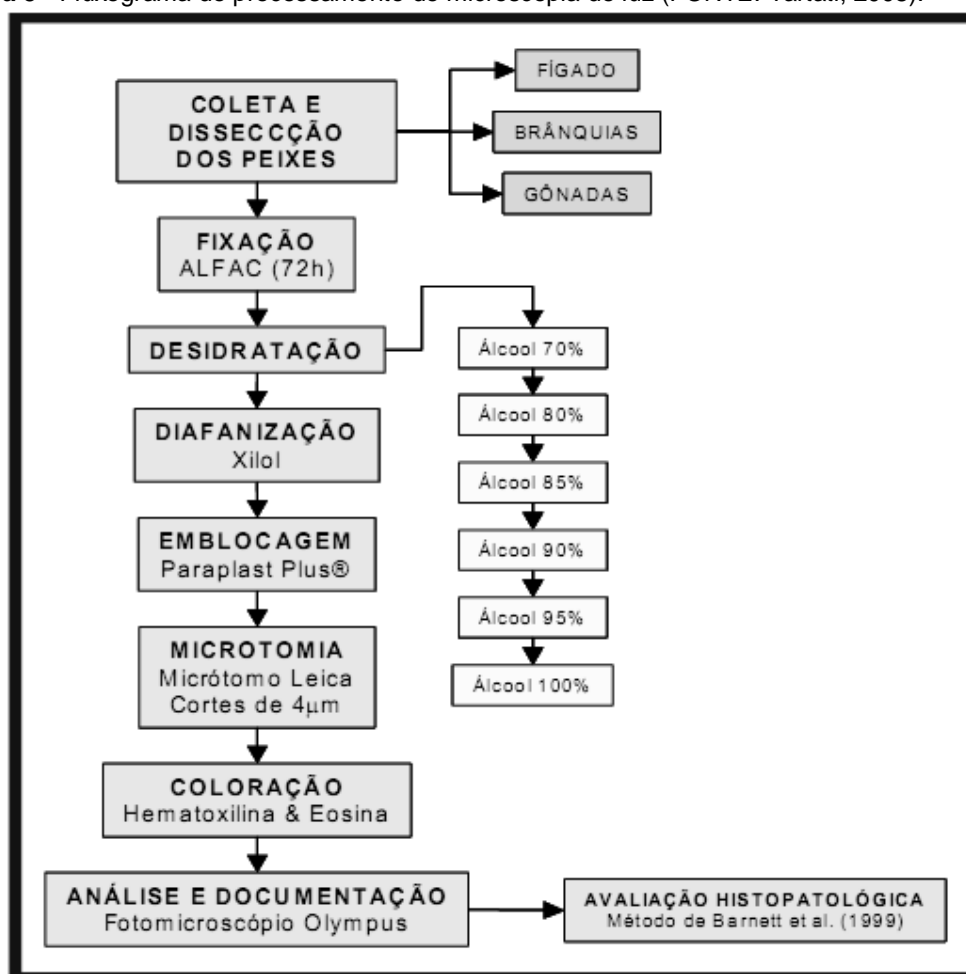
Após a contaminação com o poluente, cinco indivíduos controle e dez experimentais foram sacrificados seguindo os tempos de 1h, 2h, 4h, 8 h, 12h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao Folidol® 600, sendo as brânquias retiradas. As brânquias seguiram o processamento de rotina para microscopia de luz.

3.4. Processamento Histológico – Microscopia de Luz

Após fixação, em ALFAC, as brânquias seguiram o processamento histológico para microscopia de luz. As peças foram desidratadas em séries alcoólicas crescentes, diafanizadas em xileno, impregnadas e incluídas em Paraplast Plus®.

A trimagem ocorreu em um micrótomo para parafina marca Leica RM 2145 e a distensão dos cortes em lâminas de vidro contendo uma fina camada de albumina de Mayer 1% e água destilada. Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. O meio de montagem utilizado foi o Polymount® (Sigma). As lâminas permanentes foram previamente selecionadas em microscópio de luz Micromaster e posteriormente analisadas e fotografadas em Fotomicroscópio Olympus PM AD.

Figura 5 - Fluxograma do processamento de microscopia de luz (FONTE: Tartati, 2008).



3.5. Alterações Histológicas Analisadas

Para as brânquias, as seguintes alterações morfológicas foram analisadas: descolamento do epitélio respiratório ou edema, proliferação celular ou hiperplasia do epitélio interlamelar (fusão das lamelas respiratórias), aneurisma ou congestão sangüínea. As alterações branquiais foram identificadas segundo MALLAT (1985) e FANTA *et al.* (2003).

3.6. Análise dos Resultados

As alterações histopatológicas observadas nas brânquias foram avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET *et al.* (1999). As alterações consideradas e seus respectivos fatores de importância estão listados na Tabela 1. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores de 0 a 6 para as alterações observadas, sendo: 0 = inalterado, 2 = ocorrência ocasional, 4 = ocorrência moderada e 6 = ocorrência severa (lesão difusa). Os valores intermediários também foram considerados. Usando os fatores de importância e a pontuação atribuída, os Índices das Brânquias (I_B) foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$I_B = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

onde, pr = padrão de reação, alt = alteração, a = pontuação atribuída à alteração, e w = fator de importância. Estes índices representam o grau de injúria do órgão, sendo que um índice de lesão com valor elevado representa alto grau de injúria do órgão.

Tabela 1 - Exemplos de fatores de importância utilizados no cálculo do índice de lesões segundo bernet *et al.* (1999).

Órgão	Lesão	Fator de importância
Brânquias	Descolamento do epitélio	1
	Aneurisma	1
	Hiperplasia	2
	Fusão de lamelas secundárias	2

4. RESULTADOS

4.1. Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para *Rhamdia quelen*

Os resultados da determinação de uma dose subletal de Folidol® 600 para juvenis de *Rhamdia quelen* podem ser observados na Tabela 2. Vale ressaltar que os testes tiveram a duração de 96 horas.

Com base nos resultados obtidos, a dose de 0,01mL/L de Folidol® 600 correspondendo a 6mg/L do princípio ativo Paration metílico, foi considerada subletal, sendo escolhida para o experimento agudo, visando à análise histológica do tecido branquial. Os animais dos grupos controle, que não receberam o contaminante, permaneceram dentro dos padrões normais de sobrevivência durante todo o período experimental (MELO & FANTA, 2004).

Tabela 2 - Número de peixes mortos correspondente à concentração de Folidol® 600 administrada durante a determinação de sua dose subletal para juvenis de *Rhamdia quelen*

Concentração de Folidol® 600 em mL/L	Nº inicial de peixes	Nº de peixes mortos por período de observação (horas)			
		24	48	72	96
0,04	10	10	-	-	-
0,03	10	10	-	-	-
0,02	10	10	-	-	-
0,01	10	0	0	0	0
Controle	10	0	0	0	0
0,01 – repetição 1	10	0	0	0	0
0,01 - repetição 2	10	0	0	0	0
Controle- repetição 1	10	0	0	0	0
Controle – repetição 2	10	0	0	0	0

Fonte: Melo e Fanta, 2004

4.2. Descrição Histológica da Estrutura Branquial de Animais Controle

A observação macroscópica das brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen* mostrou que as mesmas são formadas por quatro pares de arcos branquiais, localizados em cada faringe, conforme descrito para outras espécies de teleósteos. A estrutura branquial consiste de três componentes: os arcos branquiais, as lamelas primárias (ou filamentos) e as lamelas secundárias. Os arcos branquiais atuam como suporte das lamelas primárias (Fig. 6A) as quais

sustentam as lamelas secundárias (Fig. 6A), e estas são os locais onde ocorrem as trocas gasosas.

Revestindo o arco branquial, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares, encontram-se o epitélio branquial. Esse epitélio é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloreto (Fig. 6B). As células do tecido epitelial mostraram-se achatadas. As células de cloreto e as glândulas mucosas foram observadas na base da lamela secundária.

O segundo tipo de epitélio é o chamado epitélio respiratório, que recobre as lamelas respiratórias, também chamadas de lamelas secundárias. É constituído de uma única camada de células pavimentosas, através das quais ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e o meio (Fig. 6B).

As células secretoras de muco são geralmente encontradas nos filamentos, mas o muco pode ser encontrado sobre o epitélio respiratório. O epitélio respiratório está apoiado sobre uma lâmina basal e esta sobre um grupo de células chamadas células pilares (Fig. 6B). O arranjo destas células permite a formação de canais por onde circula o sangue. Tais canais não são endotélios verdadeiros, pois não são revestidos por epitélio. São unicamente formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células pilares.

Nas brânquias dos animais controle foram observadas também algumas alterações histopatológicas, que podem ser analisadas na Tabela 3, sendo descritas a seguir.

Todos os peixes considerados como controle apresentaram a alteração descolamento epitelial. A hiperplasia, o aneurisma e a fusão de lamelas secundárias também foram evidenciados em peixes do grupo controle. A descrição detalhada das mesmas foi realizada nas alterações patológicas observadas nos animais experimentais.

Figura 6 - Organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* controle. A - corte longitudinal mostrando as lamelas primárias (LP) e as lamelas secundárias (LS) → indica lamela secundária sem alteração histopatológica. Microscopia de luz. Aumento: 40x. Coloração: H.E. B – observar lamela primária (LP), lamelas secundárias (LS), célula epitelial (EP), célula mucosa (MU), célula de cloreto (CC) e célula pilar (PI). Microscopia de luz. Aumento: 40x. Coloração: H.E. Tempo de coleta – 4h.

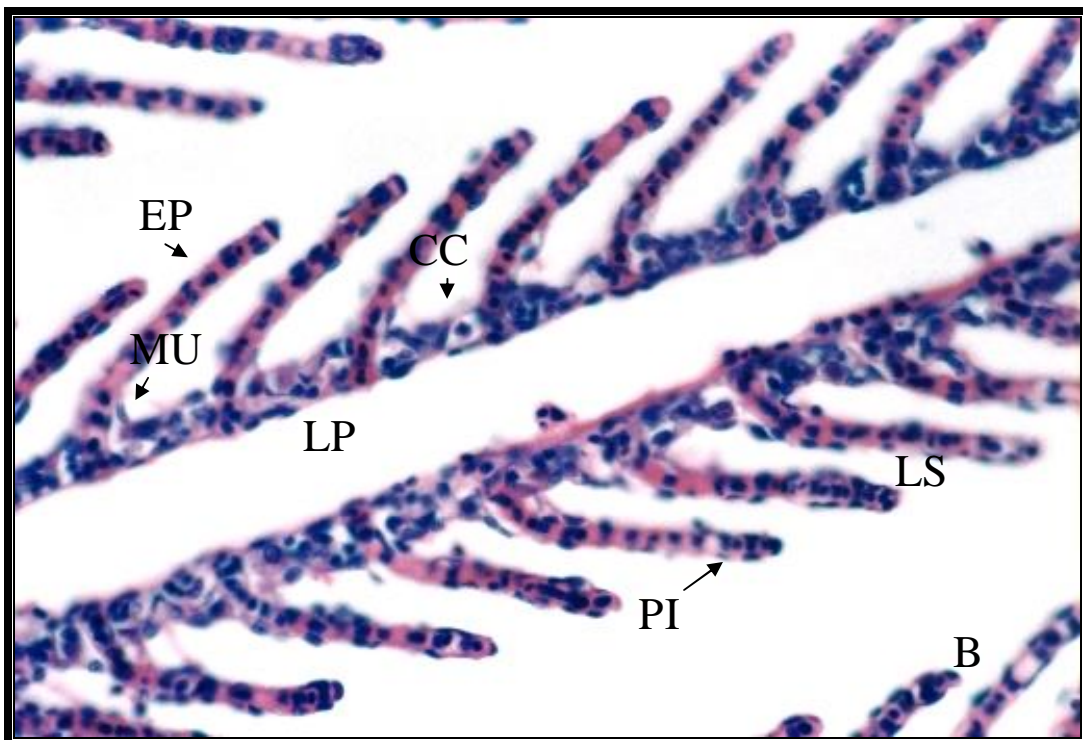
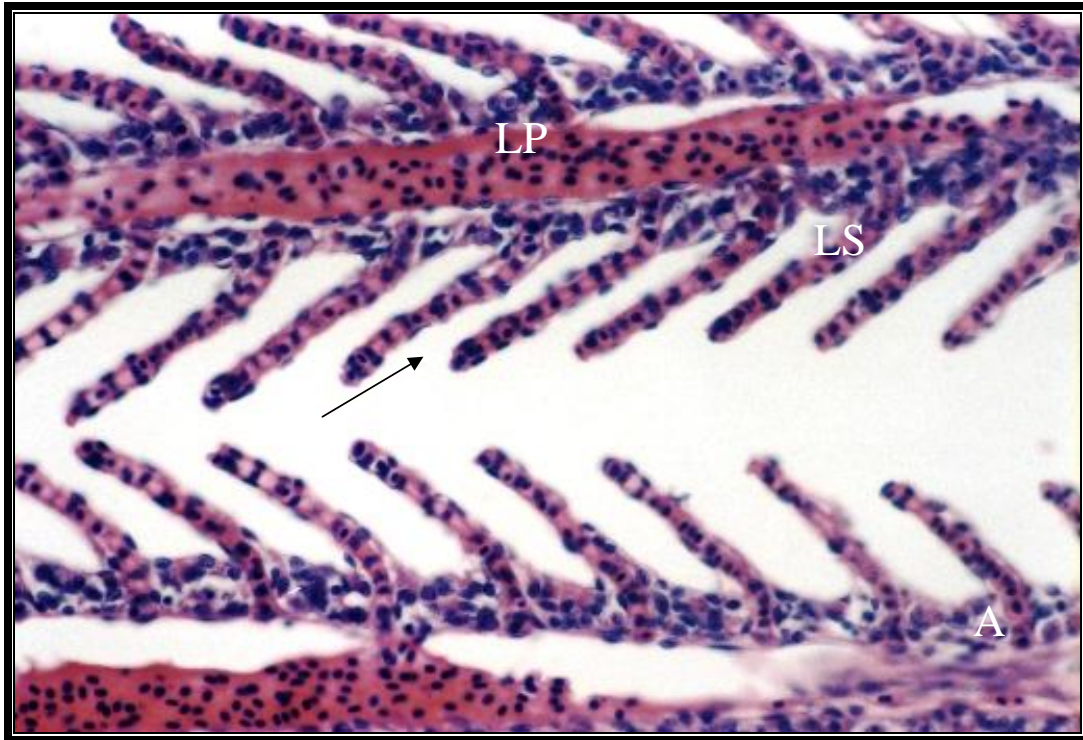
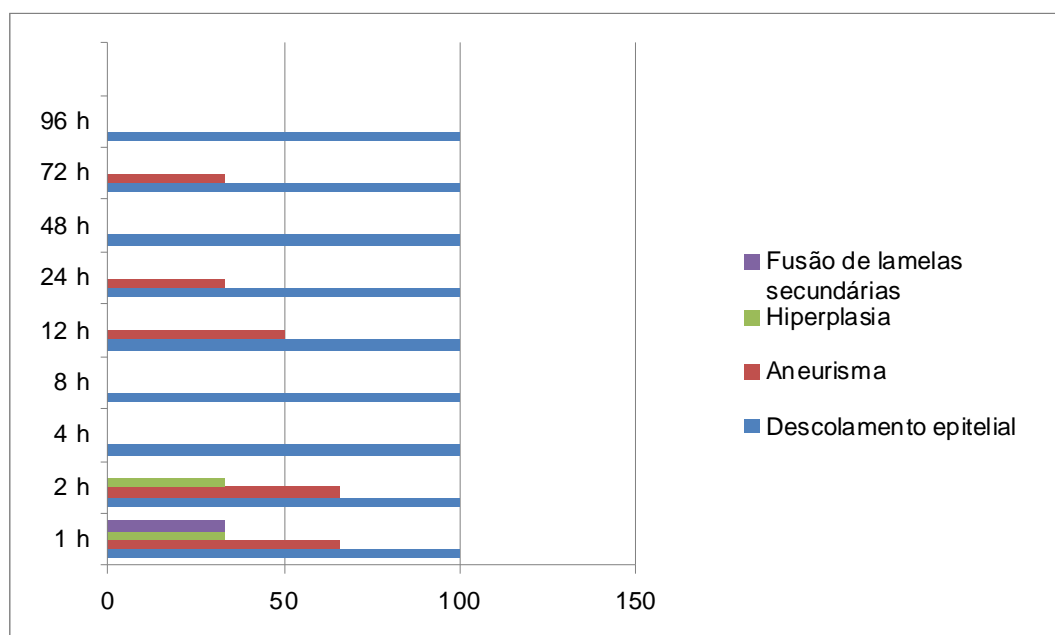


Tabela 3 – Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em juvenis de *rhamdia quelen* do grupo controle nos diferentes tempos de coleta.

Tempo de exposição	Nº de indivíduos de controle	% de descolamento epitelial	% de hiperplasia	% de aneurisma	% de fusão
1 h	3	100	33	66	33
2 h	3	100	33	66	0
4 h	2	100	0	0	0
8 h	2	100	0	0	0
12 h	2	100	0	50	0
24 h	3	100	0	33	0
48 h	3	100	0	0	0
72 h	3	100	0	33	0
96 h	3	100	0	0	0

Figura 7 - Porcentagem de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias dos juvenis de *Rhamdia quelen* dos grupos controle, nos diferentes tempos de coleta.



4.3. Descrição Histológica da Estrutura Branquial de Animais Experimentais

Analisando as brânquias dos animais experimentais submetidos à dose de 0,01mL/L do organofosforado Folidol® 600 podemos observar as seguintes histopatologias que estão descritas, de forma qualitativa abaixo, e podem ser visualizadas nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

- Descolamento do Epitélio Respiratório ou Edema: É caracterizado pelo descolamento de células epiteliais na lamela secundária. Corresponde a uma alteração caracterizada pela elevação de uma lâmina contínua do

epitélio lamelar para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue.

- **Aneurisma ou Congestão Sangüínea:** Ocorre o aumento do volume de sangue em uma região por intensificação do aporte sangüíneo ou pela diminuição do escoamento venoso. Quando há lesão das células pilares, esta congestão é seguida de uma dilatação do espaço sangüíneo.
- **Proliferação Celular ou Hiperplasia do Epitélio Interlamelar:** A hiperplasia observada é uma alteração que ocorre entre as lamelas secundárias havendo o aumento do número de células devido à multiplicação celular. Neste trabalho, em muitos casos foi evidenciada a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias decorrente desta multiplicação celular.
- **Fusão das lamelas secundárias:** É determinada pela redução na área respiratória total das brânquias, resultando na diminuição da capacidade de captação de oxigênio pelas brânquias do peixe. As áreas de fusão de lamelas estão freqüentemente associadas com hipertrofia e proliferação de células mucosas.

Na Tabela 4 temos a porcentagem de alterações histopatológicas branquiais observadas nos diferentes tempos de exposição ao Folidol® 600, na dose de 0,01mL/L deste organofosforado.

O descolamento epitelial foi à alteração histopatológica mais freqüente, estando presente em todos os tempos de exposição ao Folidol® 600 aos quais os peixes foram submetidos. O aneurisma, segunda lesão com maior número de ocorrências, apareceu em todos os tempos de exposição, com maior ou menor intensidade. No tempo de 2 horas foi observado o maior número de aneurismas (80%) enquanto que no tempo 48 horas de exposição a menor porcentagem de aneurisma foi encontrada (20%).

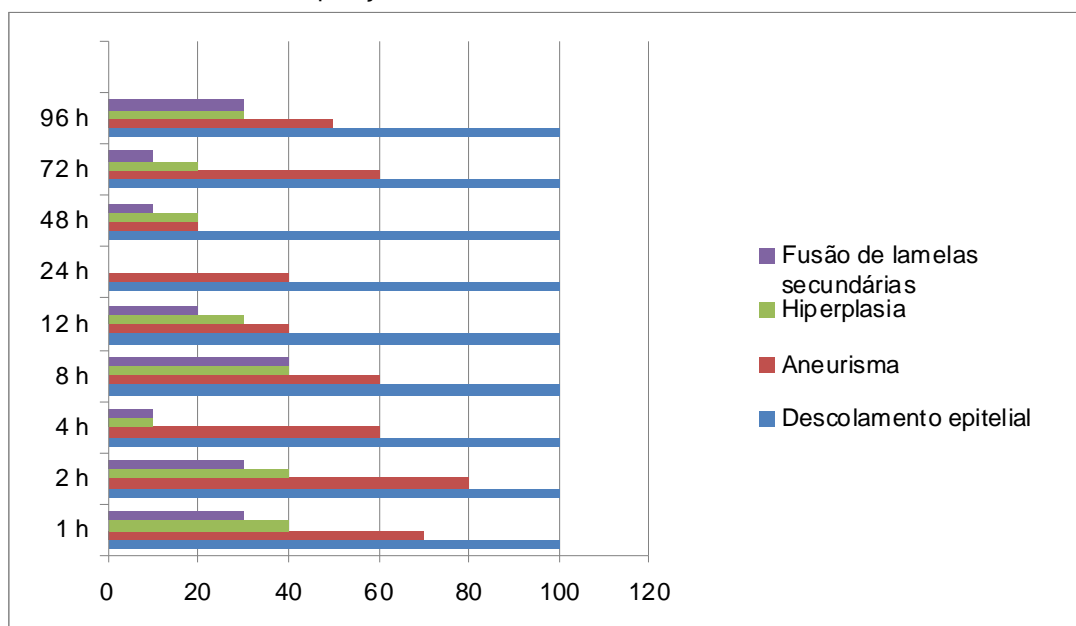
As alterações histopatológicas caracterizadas como hiperplasia e fusão de lamelas secundárias não foram evidenciadas no tempo de 24 horas de exposição ao organofosforado Folidol® 600. A fusão de lamelas secundárias foi a alteração

que se mostrou com menor número de ocorrências, sendo que esta ocorrência sempre esteve associada a existência de hiperplasia.

Tabela 4 – Porcentagem de lesões histopatológicas encontradas em juvenis de *Rhamdia quelen*. nos diferentes tempos de exposição ao folidol®.600.

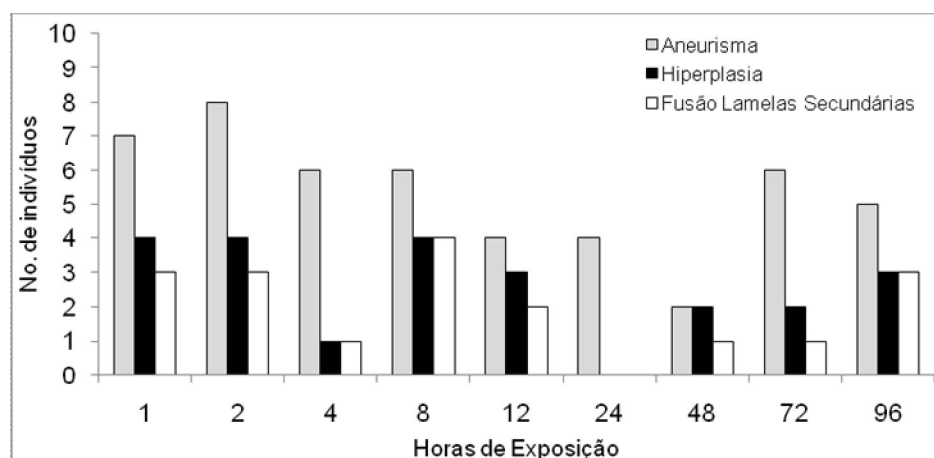
Tempo de exposição	Número de indivíduos	% de Descolamento do epitélio	% de Aneurisma	% de Hiperplasias	% de Fusão de lamelas secundárias
1 h	10	100	70	40	30
2 h	10	100	80	40	30
4 h	10	100	60	10	10
8 h	10	100	60	40	40
12 h	10	100	40	30	20
24 h	10	100	40	0	0
48 h	10	100	20	20	10
72 h	10	100	60	20	10
96 h	10	100	50	30	30

Figura 8 – Porcentagem de alterações histopatológicas observadas nos juvenis de *Rhamdia quelen* expostos a concentração de 0,01mL/L de Folidol® 600 após os testes de 1h, 2h,4h, 8h, 12 h, 24h, 48h, 72h e 96h de exposição.



A figura 9 relaciona o número de indivíduos que apresentaram lesões branquiais nos tempos de exposição ao Folidol® 600.

Figura 9 - Número de indivíduos juvenis de *Rhamdia quelen* afetados por tipo de lesão após exposição ao Folidol® 600 nos testes de 1h, 2h, 4h, 8h, 12 h, 24h, 48h, 72h e 96h de exposição.



Na Tabela 5 temos o número de indivíduos que sofreram lesões nas brânquias e o tipo de lesão, nos tempos de exposição ao Folidol® 600.

Tabela 5: Ocorrência de lesões em brânquias de *Rhamdia quelen* por tempo de exposição ao Folidol® 600. Estão indicados o “n” (entre parênteses) e o número de indivíduos com a lesão (Exp. = experimento)

Tempo de exposição	Descolamento do epitélio		Aneurisma		Hiperplasia		Fusão de lamelas secundárias	
	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle
1 h	10(10)	3(3)	7(10)	2 (3)	4(10)	1(3)	3(10)	1(3)
2 h	10(10)	3(3)	8(10)	2(3)	4(10)	1(3)	3(10)	0(3)
4 h	10(10)	2(2)	6(10)	0(2)	1(10)	0(2)	1(10)	0(2)
8 h	10(10)	2(2)	6(10)	0(2)	4(10)	0(2)	4(10)	0(2)
12 h	10(10)	2(2)	4(10)	1(2)	3(10)	0(2)	2(10)	0(2)
24 h	10(10)	2(2)	4(10)	1(2)	0(10)	0(2)	0(10)	0(2)
48 h	10(10)	2(2)	2(10)	0(2)	2(10)	0(2)	1(10)	0(2)
72 h	10(10)	3(3)	6(10)	1(3)	2(10)	0(3)	1(10)	0(3)
96 h	10(10)	3(3)	5(10)	0(3)	3(10)	0(3)	3(10)	0(3)

4.4. Índice de Lesão

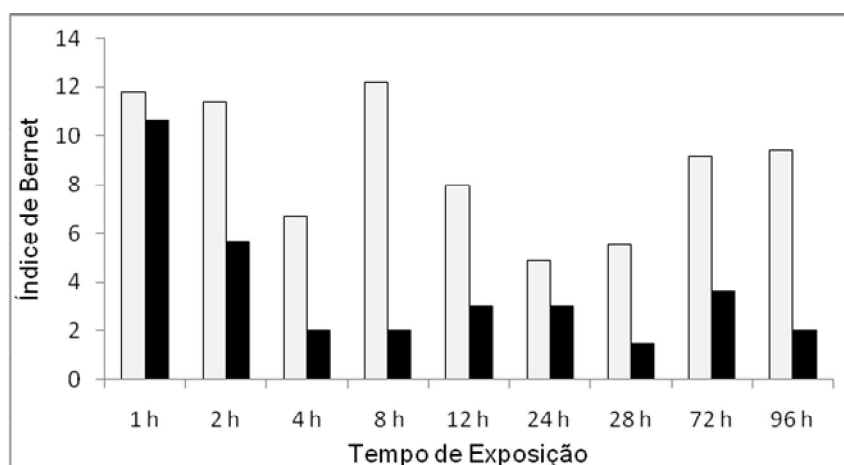
Levando-se em consideração as alterações histopatológicas observadas nos tecidos branquiais, sendo que valores diferentes foram atribuídos de acordo

com a intensidade da lesão, foram obtidos os seguintes índices de lesão conforme BERNET *et al.* (1999).

Tabela 6: Índice de Bernet. Valores médios, máximos e mínimos para cada hora de exposição e seguida de sua situação controle.

Tempo de Exposição	Média	Máx	Mín	n
1 hora	11.77	30	1	10
Controle	10.67	25	1	3
2 horas	11.40	30	1	10
Controle	5.67	9	4	3
4 horas	6.70	25	3	10
Controle	2.00	2	2	2
8 horas	12.20	30	2	10
Controle	2.00	2	2	2
12 horas	8.00	20	1	10
Controle	3.00	4	2	2
24 horas	4.90	8	2	10
Controle	3.00	4	2	2
48 horas	5.50	25	1	10
Controle	1.50	2	1	2
72 horas	9.18	30	3	10
Controle	3.67	6	2	3
96 horas	9.40	25	2	10
Controle	2.00	2	2	3

Figura 10 - Valores médios para índice de Bernet (colunas em cinza) aplicados por tempo de exposição e seu respectivo controle (colunas em preto). Número de indivíduos por teste apresentado na tabela 5.



O índice de lesão assemelha-se bastante entre os peixes nas primeiras horas de exposição ao Folidol® 600, sendo que no tempo de 8 horas ele alcança a maior média (12,20).

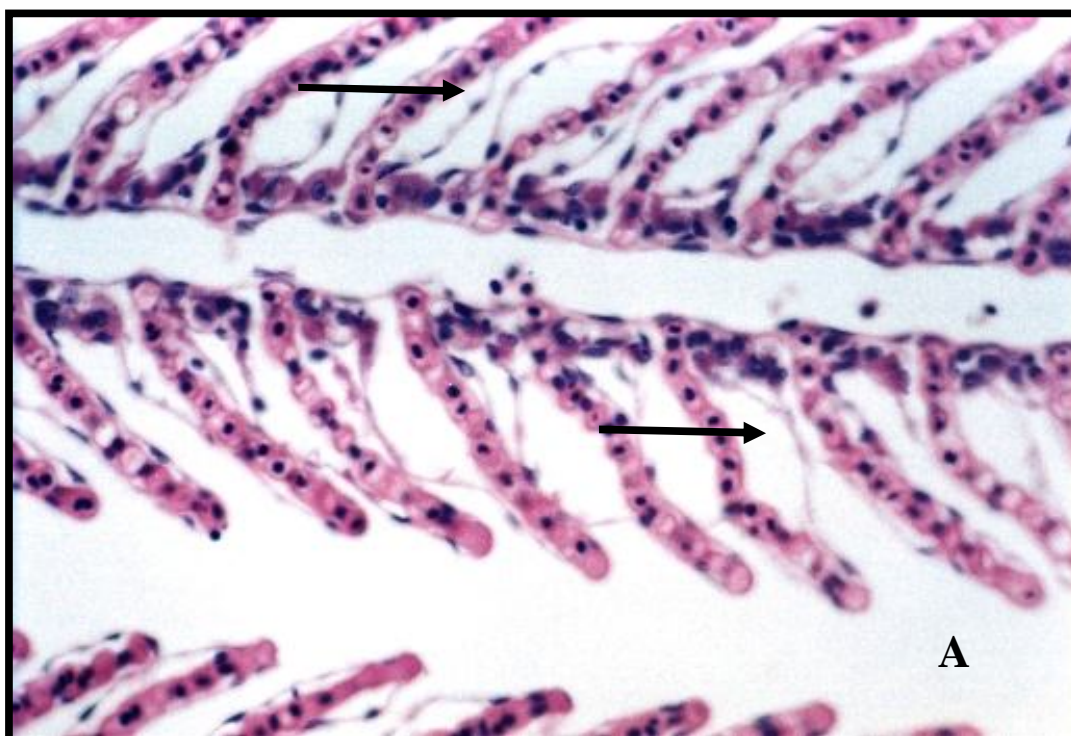
Nos tempos de 24 e 48 horas, as médias são bem próximas, assim como se assemelham as médias entre os tempos de 72 horas e 96 horas.

Já entre os indivíduos do grupo controle, a maior média (10,67) foi encontrada no tempo de 1 hora.

O grupo experimental que apresentou a menor média do índice de Bernet foi o de 24 horas (4,90). O menor valor máximo do índice foi encontrado também nesse grupo experimental, sendo esse índice igual a 8.

Um índice de lesão com valor elevado representa alto grau de injúria do órgão.

Figura 11 - A - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 1 h. Observar lamelas secundárias com descolamento epitelial (➡➡). B - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 2h. Observar lamelas secundárias com descolamento epitelial (➡➡). Microscopia de luz. Aumento 40x. Coloração: H.E.



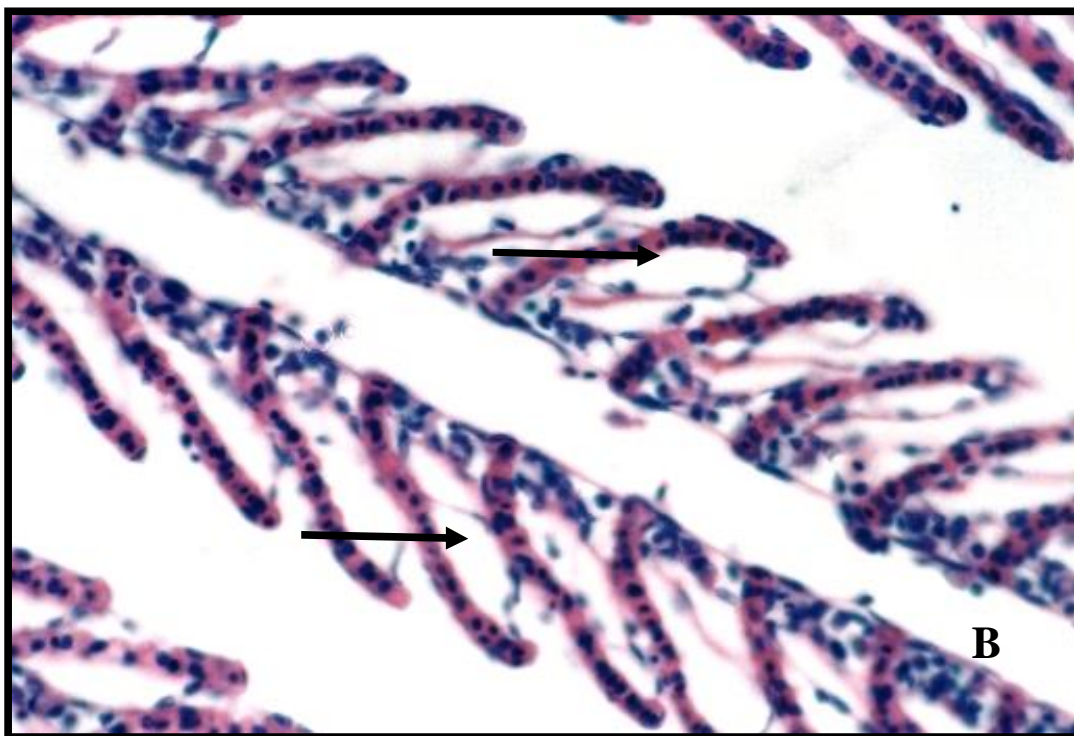
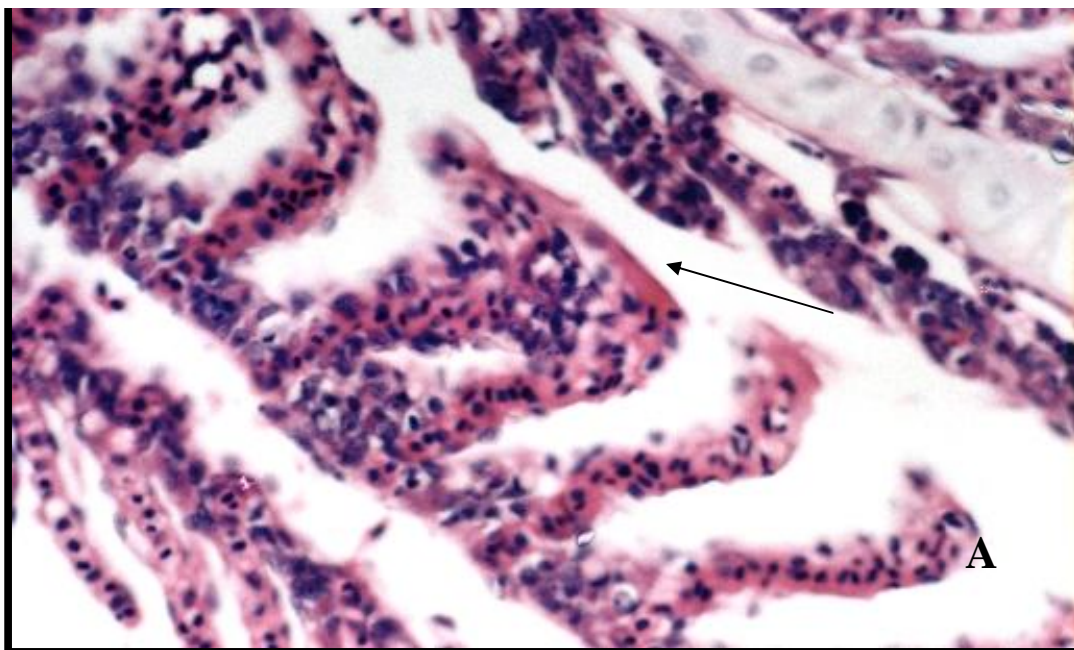


Figura 12 – A - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 8h. Observar fusão das lamelas secundárias e hiperplasia (➡). B - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 96h. Observar fusão das lamelas secundárias e hiperplasia (➡). Microscopia de luz. Aumento 40x. Coloração: H.E.



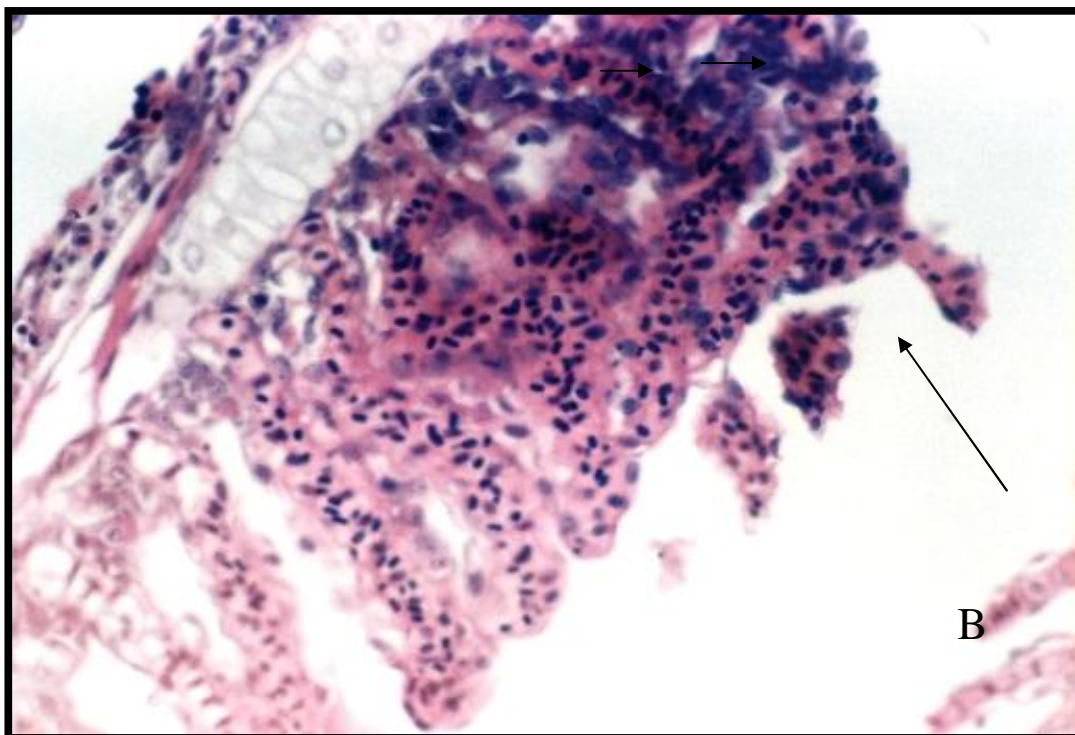
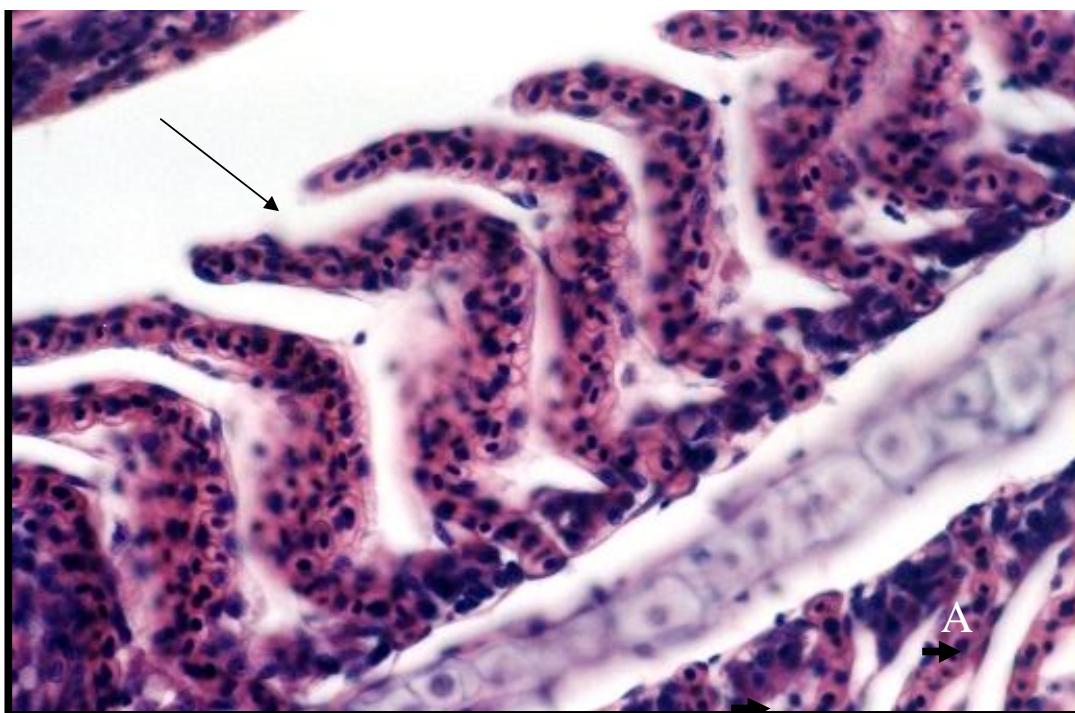


Figura 13 – A - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 12h. Observar hiperplasia das lamelas secundárias. (→)
 B - organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 48h. Observar hiperplasia das lamelas secundárias. (→).



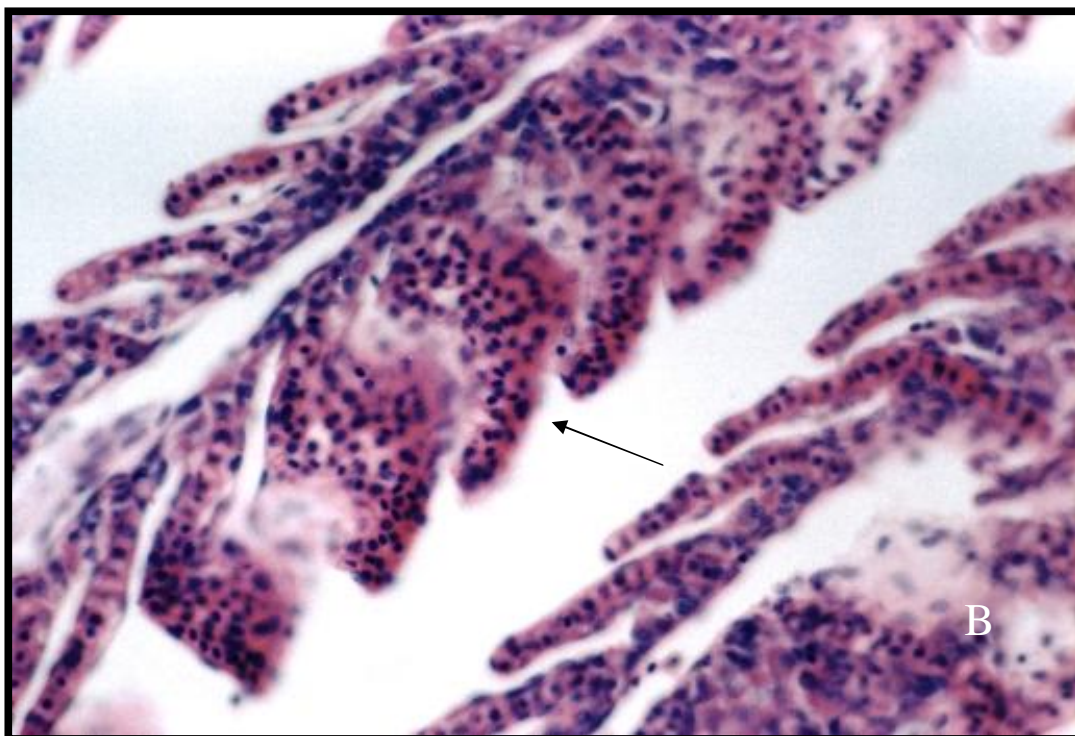
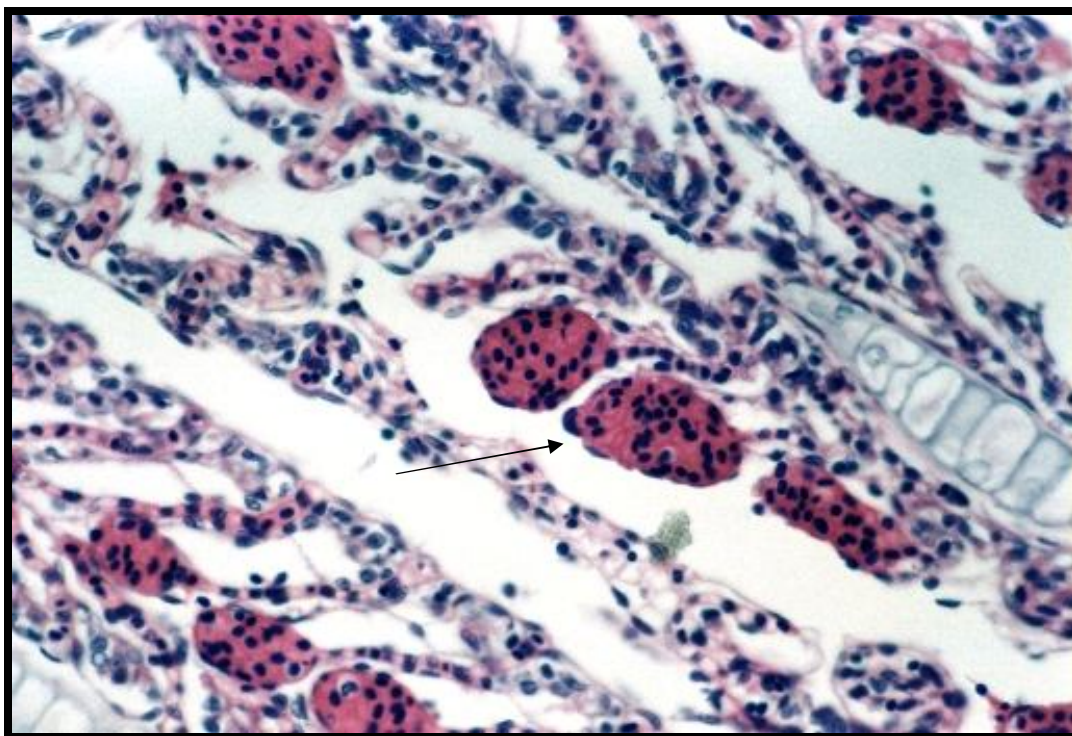


Figura 14 - Organização estrutural das brânquias de *Rhamdia quelen* exposto ao organofosforado Folidol – 72h. Observar a presença de aneurismas nas lamelas secundárias. (→). Microscopia de luz. Aumento 40x. Coloração: H.E.



5. DISCUSSÃO

A intensificação das atividades de pecuária e agricultura tem contribuído para o aumento da utilização de agrotóxicos. Estes evitam as perdas que poderiam ser causadas pelas pragas nas produções de alimentos. Uma vez aplicados, os agrotóxicos podem contaminar os componentes bióticos e abióticos, como as plantas, o solo, a rede hidrográfica local e atingir organismos não alvo, tais como os peixes e outros (MATAQUEIRO & MACHADO-NETO, 2002).

Para o presente estudo, procurou-se utilizar um organofosforado empregado rotineiramente na agricultura do estado do Paraná, o Folidol® 600 que possui o Paration Metílico como princípio ativo. É considerado um produto extremamente tóxico pela empresa formuladora. A espécie de peixe estudada, *Rhamdia quelen* apresentou-se como um ótimo organismo experimental, devido à facilidade de obtenção e de manutenção em condições laboratoriais e por ser uma espécie nativa de grande interesse comercial e muito abundante nos rios do Paraná. (MELO & FANTA, 2004).

As brânquias foram os órgãos escolhidos para esse estudo porque estão em contato íntimo com a água, estando sujeitas a ação de poluentes. As lesões causadas por esses poluentes no tecido branquial afetam as funções fisiológicas do indivíduo como um todo. Adaptações morfofuncionais, selecionadas ao longo da evolução, foram necessárias para que os peixes obtivessem sucesso no povoamento de ambientes aquáticos tão diversos. Nesse contexto adaptativo, as brânquias dos peixes exercem papéis vitais, visto que, além de ser o principal sítio de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e gustação. Tendo em vista a necessidade dos animais aquáticos exporem ao ambiente grandes áreas de um tecido delicado, como as brânquias, estas podem servir como indicadores da qualidade da água (MACHADO, 1999).

A histologia se revelou uma ótima forma de se avaliar as alterações morfológicas nas brânquias dos peixes. Representa um instrumento útil para se avaliar o quão intenso foram os danos causados pela exposição ao Folidol® 600. Lesões histopatológicas têm sido freqüentemente descritas como importantes ferramentas em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de interpretação

tanto em situações de exposição aguda quanto crônica (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). A presença de lesões nas brânquias de peixes pode ser interpretada como resultado de efeitos agudos de xenobiontes (ZODROW *et al.* 2004).

Dentre as alterações observadas, o descolamento epitelial foi à alteração histopatológica mais freqüente, estando presente em todos os tempos de exposição ao Folidol® 600 ao quais os peixes foram submetidos. Nos indivíduos do grupo controle essa lesão também apareceu em todos os peixes. O descolamento epitelial é caracterizado pelo descolamento de células epiteliais na lamela secundária.

Quando observamos o descolamento do epitélio respiratório ou edema há separação entre o espaço sangüíneo e o epitélio que o recobre devido a uma infiltração de líquido originário do sangue após aumento de permeabilidade na parede dos vasos ou distúrbio circulatório local. Esta alteração causa necrose das células epiteliais e quando é intensa pode ter efeitos fisiológicos como uma letal disfunção respiratória e osmorregulatória (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995). O descolamento de epitélio observado neste estudo também foi relatado por ARELLANO *et al.* (1999) e FANTA *et al.* (2003) em peixes expostos a cobre e organofosforados, respectivamente. Neste trabalho, o descolamento do epitélio branquial não reflete ações específicas do agente, isto é, do Folidol® 600, mas sim, uma resposta fisiológica do peixe ao ambiente em que se encontra. Esta resposta pode ser regulada por fatores internos às brânquias ou ser parte de uma resposta sistêmica ao estresse (MALLAT, 1985). Além disso, essa alteração foi observada em todos os animais, tanto nos do grupo controle quanto nos do grupo experimental. Sendo assim, esse fato pode refletir ainda alguma falha metodológica.

A hiperplasia, outra das lesões observadas, das células epiteliais é uma alteração que ocorre entre as lamelas secundárias e pode levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias. Segundo FANTA E MACHADO (2003) a proliferação celular entre as lamelas secundárias diminui a área superficial e dificulta as trocas gasosas. A hiperplasia também foi descrita por FANTA *et al.* (2003) nas brânquias de *Corydoras paleatus* exposto ao Folidol® 600. Na presença do organofosforado Diazinon, DUTTA *et al.* (1993) relata que esse mesmo tipo de lesão afetou o tecido epitelial dos peixes.

A fusão das lamelas secundárias determina uma redução na área respiratória total das brânquias, resultando na diminuição da capacidade de captação de oxigênio pelas brânquias do peixe (OJHA *et al.*, 1989). As áreas de fusão de lamelas estão freqüentemente associadas com hipertrofia e proliferação de células mucosas.

Tanto a hiperplasia quanto a fusão das lamelas secundárias foram descritas em estudos envolvendo outros tipos de poluentes ambientais, como os metais pesados. ARELLANO *et al* (1995) verificou essas alterações em brânquias de peixes expostos ao cobre e OLIVEIRA RIBEIRO *et al* (1996) em peixes expostos ao mercúrio.

Neste trabalho foi observada uma grande incidência de aneurismas tanto nos animais controle quanto nos experimentais. Para VAN DEL HEUVEL *et al* (2000), os aneurismas do tecido branquial provavelmente resultam da morte das células pilares resultando na perda de integridade estrutural da lamela secundária e acúmulo de células sanguíneas. Isto pode ter ocorrido devido a grande presença de descolamentos branquiais observados.

Alterações como descolamento de epitélio respiratório, hiperplasia, fusão das lamelas secundárias induzidas por agentes irritantes nas lamelas branquiais não refletem ações específicas do agente, mas sim refletem uma resposta fisiológica do peixe. Esta resposta pode ser regulada por fatores internos as brânquias ou ser parte de uma resposta sistêmica ao estresse.

Estas alterações nas lamelas branquiais apresentam um efeito comum que é o aumento da distância entre a água e o sangue, distanciando, com isso, o agente agressor do sistema de distribuição de moléculas do organismo (MALLAT, 1985).

De uma forma geral, estas alterações lesivas acarretam uma diminuição da eficiência respiratória, podendo, quando ocorrendo de forma intensa e combinada, levar a morte do indivíduo (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995).

O índice de lesão (Bernet) obtido neste trabalho tem como objetivo refletir a integridade do órgão analisado. Os maiores índices obtidos, isto é, acima de 10.0 ocorreram nas primeiras oito horas de exposição ao Folidol® 600 e nos animais controle correspondendo a uma hora de exposição ao organofosforado. Nos outros tempos de exposição temos índices de lesão menores, sugerindo que

possa ter ocorrido algum tipo de adaptação.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, juvenis de *Rhamdia quelen* foram expostos a bioensaios envolvendo Folifol® 600, um organofosforado utilizado por agricultores no estado do Paraná. A dose de 0,01mL/L de Folidol® 600 correspondendo a 6mg/L do princípio ativo Paration metílico, foi considerada subletal. A estrutura branquial dos animais controle bem como os experimentais apresentam morfologia branquial padrão descrita para outras espécies de peixes teleósteos. Isto é, as branquiais são constituídas pelos arcos branquiais, as lamelas primárias e as lamelas secundárias. Tanto nos animais experimentais quanto nos animais controle, no primeiro caso em maior incidência, foram observados alterações branquiais, tais como, o descolamento epitelial, a hiperplasia, o aneurisma e a fusão de lamelas secundárias. O índice de Bernet indica que a higidez dos animais está comprometida principalmente nas primeiras oito horas de exposição ao Folidol® 600. Pode-se finalmente concluir que a morfologia branquial de *Rhamdia quelen* foi alterada pela exposição a 0,01mL/L de Folidol® 600.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. C. R. de; HONRADO, H. R. R.; CORREIA, R. B. **Intoxicação em peixes por pesticidas utilizados na agricultura**. Disponível em: <<http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/G24.HTM>> Acesso em: 08/06/2007.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 44, p. 62-72, 1999.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 12(1).61-72, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/csc/v12n1/07.pdf>>. Acesso em: 03/10/2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12714: Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema estático. Rio de Janeiro, 1993.
- BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during Dimethoate exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Oxon, v. 33, n. 5, p. 423-426, 1995.
- BERNET, D.; SCHMITD, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 22, p. 25-34, 1999.
- CAPINPIN, E. C. Gill lesions in Nile tilapia *Oreochromis fingerlings* associated with acute Malathion poisoning. **Philippine Journal of Science**, Manila, v. 123, n. 4, p. 283-291, 1994.
- CAJARAVILLE MP, BEBIANNO JM, BLASCO J, PORTE C, SARASQUETE C, VIARENGO A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ** 2000; 247:295-311
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1990. L5.019-I: ÁGUA – TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM PEIXES – PARTE I – SISTEMA ESTÁTICO, SÃO PAULO. CHEREMISINOFF, N. P.; KING, J. A. **Toxic properties of pesticides**. New York: arcel Dekker, 1994. 330 p.
- CLEMENTS WH. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization. *J. Ecosy Stressand Rec* 2000; 7:113-116.)

- COOPER CM. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems – a review. *J Environ Qual* 1993; 22: 402-408
- COUTINHO C.F.B. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**. Curitiba, v. 15, jan./dez. 2005. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/pesticidas/article/viewFile/4469/3518>> Acesso em: 14/08/08.
- DE SILVA, P. M. C. S.; SAMAYAWARDHENA, L. A. Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 53, p. 248-254, 2002. Environmental Research, section B.
- DUTTA, H. M. ; ADHIKARI, S.; SINGH, N. K.; ROY, P. K.; MUNSHI, J. S. D. Histopathological Changes Induced by Malathion in the Liver of a Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 51, p 895-900, 1993.
- EVANS, H. D.; PIERMARINI, M. P.; CHOE, P. K. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiol Rev** 85: 97–177, 2005. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/85/1/97> >. Acesso em: 05/09/2008.
- FANTA, E. Ação de poluentes sobre o tecido. In: Heid Sueli Leme dos Santos. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 80p.
- FANTA, E. (1995); Influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichilidae) – **Arquivos de Biologia e tecnologia** – v. 38, p. 1237-1251
- FANTA, E.; RIOS, F. S.; VIANNA, A. C. C.; ROMÃO, S.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water, and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 54, p. 119–130, 20
- FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EPU, 1980. 196 p.
- FERGUNSSON, H.W. **Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleostes**. 3. ed. Iowa: University Press, 1995. 263p.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. de A.; RAMOS, M. de L. L. de C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**. São

Paulo: CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1990.

GILL, T. S.; PANT, J. C.; PANT, J. Gill, Liver, and Kidney Lesions Associated with Experimental Exposures to Carbaryl and dimethoate in the Fish (*Puntius conchonus* Ham.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, p. 71-78, 1988.

GOMES, L. de C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30A, p. 179-185, 2000.

GOSS, G. G.; LAURENT, P.; PERRY, S. F. Gill morphology during hypercambrowbulhead (*Ictalurus nebulosus*): role of choride cells and pavement cells I base regulation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 705-718, 1994.

GUIMARÃES, A. T. B. **Efeitos do uso de Trichlorfon em tratamentos contra parasitoses em piscicultura: análise das taxas de crescimento, avaliação histopatológica e sua ação sobre a atividade da colinesterase em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Neopterygii)**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

HAGAR, H. H.; FAHMY, A. H. A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 133, p. 161-170, 2002.

HARTL, M. G. J.; HUTCHINSON, S.; HAWKINS, L. E.; ELEDJAM, M. The biometry of gills of 0-group European flounder. **Journal of Fish Biology**, London, v. 57, p. 1037-1046, 2000.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress**. Boca Roton: Lewis Publishers, 1992. p.155-208.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Manual de métodos para avaliação de toxicidade**. Curitiba, 1997.

JOBLING, S. e SUMPTER, J.P. Detergent components in seware effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using raimbow tout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic. Toxicol.** v. 27, p. 361-372, 1993.

JOHNSON, L.L. STEHR, C.M. OLSON, O.P. MYERS, M.S. PIERCE, S.M. WIGREN, C.A. McCAIN, B.B. VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environ. Scienc. Technol.** v. 27, p. 2759-2771, 1993.

- JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, Oxon, v. 166, n. 3, 2001.
- LANGENBACH, T., 1999. Nova lógica no controle de agrotóxicos. *Ciência Hoje*. 26, 62-64.
- LARINI, L. Toxicologia dos praguicidas. São Paulo: Malone, 1999. 230 p.
- LAURENT, P. Structure of vertebrate gills. In: Houlihan, D. F.; Rankin, J. C.; Shuttleworth, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University, p. 25- -61. 1982.
- MACHADO, M. R. & FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (Curitiba), Curitiba, v. 46, n. 3, p. 361–372, Jun 2003.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Unopar Científica**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.
- MACHADO NETO, J.G. **Ecotoxicologia de agrotóxicos**. Jaboticabal, FUNEP, 1991. 491p.
- MALLAT, J. Gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** (Ottawa) Ottawa, v. 42, p. 630-648, 1985.
- MATAQUEIRO, M.I & MACHADO-NETO, J.G. **Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)** 47f. Dissertação.(Aqüicultura em Águas Continentais) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2002. Disponível em:<http://caunesp.unesp.br/Publicacoes/Dissertacoes_Teses/Dissertacoes/Dissertacao%20Maria%20Isabel%20Mataqueiro.pdf>. Acesso em: 14/08/08.
- MELO, C. G & FANTA, E.S.E. **Efeitos subletais da ação do organofosforado Folidol® 600 no fígado do peixe de água doce Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) : uma análise histopatológica** .97f.Dissertação (Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- NEMR, A. E.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. **Chemosphere**, Oxon, v. 54, p. 1401-1406, 2004.
- OJHA, J.; ROOJ, N. C.; MITTAL, A. K.; MUNSHI DATTA, J. S. Lightm : 43 scanning electrn microscopic studies on the effect of biocidal plant sap the gills of a hill stream fish, Garra lanta (Ham.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 34, 165-170,1989.

- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C. S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**, Mendoza, v. 20, n. 3, p. 171-178, 1996.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.
- POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Cambridge: Blackwell Sci., 1994. P. 339-352.
- POUGH, F.H.; JANIS C.M.; HEISER J.B. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Ed., 699p., 2003.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: Mecanismos e Adaptações**. p. 531-581. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000.
- RANKIN, J.C e JENSEN F.B. **Fish ecophysiology**. London: Chapman e hall, 1993.
- RASHED MN. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake, Environ Int 2001; 27(1):27-33)
- RICHMONDS, C. R.; DUTTA, H. M. Histopathological changes induced by malathion in the gills of buegill *Lepomis macrochirus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, New York, v. 43, p. 123-130, 1989.
- RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia** Curitiba, v. 15, n. 2, p. 441-450, 1998.
- RODRIGUES, E. de L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PACHECO, F. J.; VEIGA, M. L. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500 (Trichlorfon). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 503-505, 2001.
- RUDNICKI, C.A.M. **Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin® 400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) após exposição subletal** . 74f. Dissertação (Biologia

Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; GAMON, M.; ANDREU-MOLINER, E. Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla anguilla* L. **Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, New York, v. 103 C, n. 2, 351-356, 1992

SHEPHARD, K.L. Functions for fish mucus. **Review in fish biology and fisheries**. v. 4, p. 401-429, 1994.

SCHMIDT – NIELSEN, K. Fisiologia Animal. Adaptação e meio ambiente. São Paulo: Livraria Santos Ed., p. 299-352, 1996.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M. FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 55, p. 137-159, 2003.

SILVA, H. C.; MEDINA, H. S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 105C, n. 2, p.197-201, 1993.

SOGORB, M. A., VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 128, p. 215-228, 2002.

TARTARI, E. **Análise histopatológica da ictiofauna existente no rio Azambuja – bacia hidrográfica do rio Tubarão – município de Pedras grandes/Sc**. 61f. Monografia Programa de Pós Graduação Lato Sensu em Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Biologia Celular, Setor Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 1 CD –ROM.

TAVARES-DIAS, M; MELO, J,F,B; MORAES, G; MORAES, F,R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá **Rhamdia quelen** (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.693-698, 2002.

VARÓ, I; SERRANO, PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ,F. J.; NAVARRO,J. C.Toxicity and bioconcentration of Chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, p. 623-630, 2000.

VAN DEN HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J. MacKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and gill lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-Associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 46, p. 334-341, 2000.

WARE, G. W. **Fundamentals of Pesticides**. 3. ed. Fresno: Thomson, 1991. 307 p.

ZODROW, J. M., STEGEMAN, J. J., TANGUAY, R. L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. **Aquatic Toxicology**. v. 66, p. 25-38. 2004.